

Henrique Coutinho Póvoas Esteves das Neves

Contribuição para o estudo da Polarização Celular num Plano

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Prof^a. Doutora Isabel Barahona (CiiEM/ ISCSEM)

Co-orientadora:

Prof^a. Doutora Alexandra Maia e Silva (CiiEM/
ISCSEM)

LISBOA

2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À Professora Doutora Isabel Barahona por me ter aceitado no seu laboratório e ter confiado em mim para trabalhar nesta experiência, certificando sempre que tudo o que era feito estava sempre nas melhores condições.

À Professora Doutora Alexandra Maia e Silva por me ter acompanhado durante o trabalho, reiterando sempre a importância do rigor e da postura correcta a seguir dentro de um laboratório.

Ao Professor Doutor Domingos Henrique, do Instituto de Medicina Molecular, que me recebeu sempre bem no seu laboratório e se preocupou com o progresso do trabalho, oferecendo uma ajuda muito preciosa e fornecendo os embriões de ratinhos.

À Professora Doutora Ilda Sanches e ao Professor Doutor José Paulo Sampaio, por me terem dado a hipótese de aprender com eles durante o Mestrado e pela sua infindável paciência face às minhas constantes perguntas.

Aos meus colegas de laboratório e de piso, Susana, Paulo, Teresa, Luis, Lena, Ana, Miguel, Bruno e Inês. O vosso humor e a vossa ajuda ajudaram-me imenso a conseguir suportar os momentos mais difíceis.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por me terem permitido seguir este caminho.

Ao Bruno e ao João, por terem sempre acreditado em mim e me terem apoiado.

Acima de tudo, muito obrigado à minha família e, especialmente, aos meus pais. Se não fosse pelo vosso amor e compreensão, decerto não estaria aqui.

S. P. A. N., dedico-vos este trabalho.

SUMÁRIO

A polaridade é uma propriedade fundamental das células e tecidos epiteliais. Uma das suas formas, a Polaridade Celular num Plano, ou PCP, é uma propriedade demonstrada por alguns epitélios e que está também relacionada com movimentos morfogénicos durante a gastrulação, assim como com a orientação correcta de cílios e pêlos, estando presente tanto em *Drosophila melanogaster*, como em vertebrados.

Prickle é uma das proteínas centrais da via de sinalização da PCP, via essa que permite a distribuição desigual, mas coordenada de proteínas na célula, originando assim a polaridade celular. Embora Prickle não esteja na origem da sinalização PCP, tem como função, através de um ciclo de *feedback*, acentuar as diferenças iniciais na distribuição das proteínas, contribuindo assim para uma melhor definição de polaridade.

O objectivo do nosso trabalho consistiu na confirmação de interacções que são estabelecidas entre Prickle e outras proteínas, que tinham sido previamente identificadas pelo sistema do duplo híbrido: Rock1, Pias3, Freud-1 e Myak-S.

Verificámos que as proteínas Rock1 e Pias3 interagem com o domínio PET de Prickle.

A proteína Rock1 tem várias funções, sobretudo a nível da reestruturação do citoesqueleto de actina e de proliferação e diferenciação celulares, todas elas importantes durante o desenvolvimento embrionário.

A proteína Pias3, também ela relacionada com a proliferação e diferenciação celulares, tem igualmente uma função muito importante para o desenvolvimento do cancro.

Estes resultados podem contribuir para uma melhor definição da função de Prickle na via de sinalização da PCP e são mais um indício da importância desta via para o aparecimento de células cancerosas.

ABREVIATURAS

Aa - Aminoácidos

AJC – Apical Junctional Complex

BMP – Bone Morphogenetic Proteins

CC2D1A - coiled-coil and C2 domain containing 1A

cDNA – do inglês Complementary DNA, DNA complementar

Celsr – Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor, também conhecido por Megf

Co-IP – Co-imunoprecipitação

CPCNP – Carcinoma pulmonar de células não-pequenas

Dchs – Dachsous (em vertebrados)

Dgo – Diego

DNA – do inglês Desoxyribonucleic acid, Ácido Desoxiribonucleico

Ds – Dachsous (em *Drosophila*)

Dsh – Disshevelled (em *Drosophila*)

Dvl – Disshevelled (em vertebrados)

EC – Extensão convergente

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid

FGF – do inglês Fibroblast Growth Factor, Factor de Crescimento de Fibroblastos

Fj – Four-jointed

Fmi – Flamingo

Freud - Five repressor element under dual repression binding protein, também conhecido por CC2D1A

Ft – Fat

Fy – Fuzzy

Fz – Frizzled (em *Drosophila*)

Fzd – Frizzled (em vertebrados)

GST – Glutathione S-transferase

GTP – do inglês *Guanosine triphosphate*, Trifosfato de Guanosina

GTPase – enzima do inglês *Guanosine Triphosphatase*, Trifosfatase de Guanosina

HD – do inglês *Huntington's Disease*; Doença de Huntington

HEPES – *N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*

Hipk1 - *Homeodomain interacting protein kinase 1*

HRP – do inglês *Horseradish peroxidase*, Peroxidase de rábano

Htt - Huntingtina

IFN – Interferência

IPTG - *Isopropyl- β -D-thiogalactoside*

JAK – *Janus kinase*, também conhecido por *Just Another Kinase*

JNK – *c-Jun Kinase*

kDa – kiloDalton

LB – meio *Luria Broth*

LBAp – meio *Luria Broth* com Ampicilina

Lef – *Lymphoid enhancer factor*

MEC – Matriz Extracelular

MITF - *Microphthalmia transcription factor*

MLC – *Mysin regulatory Light Chain*

Myak - Murine YAK, também conhecida por Hipk1

PAGE – Electroforese em Gel de Poliacrilamida

PAPC – Protocaderina Paraxial

Patj – *Pals1-associated tight junction*

PBS – do inglês *Phosphate Buffer Saline*, Tampão de Fosfatos

PCP – do inglês *Planar Cell Polarity*, Polaridade Celular num Plano

Pias - *Protein inhibitor of activated STAT*

Pk – *Prickle*

PKC – do inglês *Protein Kinase C*, Proteína Cinase C

Ptk – do inglês *Protein tyrosine kinase*, Proteína Cinase de Tirosina

Rho – do inglês *Rhodopsin*, Rodopsina

RNA – do inglês *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico

RNAi – *RNA interference*

Rock - *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*

Rpm – Rotações por minuto

SBMA – do inglês *spinobulbar muscular atrophy*, atrofia muscular espinhotubular

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

siRNA – *Small interfering RNA*

Sqh – *Spaghetti squash*

Stan – *Starry Night*

STAT - *Signal transducer and activator of transcription*

Stbm – *Strabismus*

SUMO – *Small Ubiquitin-like Modifier*

TBP – *TATA box-Binding Protein*

Tcf – *T-Cell Factor*

Tes - *Testin*

TGF – *Transforming Growth Factor*

Vang – *Van Gogh*

Vangl – *Van Gogh-like*

Wg – *Wingless*

Wnt – Proteína com função de receptor celular que partilha o nome com vias de sinalização em que está inserida, nome obtido através da junção de Wg e Int

WT – *Wild type*

Xpk – *Xenopus Prickle*

Zip – *Zipper interactive protein*

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Sumário	iii
Abreviaturas	v
I. Introdução	3
I.1 Uma visão global.....	3
I.2 PCP: Da <i>Drosophila</i> aos vertebrados.....	9
I.3 A via de sinalização da PCP na embriogénese e divisão celular	11
I.4 A complexidade do ouvido e a via de sinalização da PCP.....	14
I.5 Uma questão de nervos: a via de sinalização da PCP e o desenvolvimento neuronal	15
I.6 A orientação de pêlos: <i>Drosophila</i> e vertebrados	16
I.7 A via de sinalização da PCP e o cancro	18
I.8 Caracterização da proteína Prickle.....	24
I.9 Objectivo	26
II. Materiais e Métodos	31
II.1 Materiais	31
II.1.1 Sistemas biológicos usados	31
II.1.2 Clonagens em diferentes vectores de expressão em <i>E. coli</i>	31
II.1.3 Anticorpos	32
II.1.4 Meio Luria Broth (LB)	32
II.2 Métodos	33
II.2.1 Indução das proteínas de interesse	33
II.2.2 Lise celular	33
II.2.3 GST pull-down	34
II.2.4 Preparação de extractos proteicos de ratinho	34
II.2.5 Electroforese em SDS-PAGE.....	35
II.2.6 Western Blot.....	35
III. Resultados	39
III.1 Indução das proteínas de interesse	39
III.2 Ensaio para controlo da coluna de afinidade	46
III.3.1 Estudo da interacção entre Rock e Prickle.....	48
III.3.2 Estudo da interacção entre Pias e Prickle.....	54
III.3.3 Estudo da interacção entre Freud e Prickle	58

III.4 Testes de especificidade dos anticorpos	62
III.4.1 Preparação e quantificação proteica de extractos de ratinho.....	63
III.4.2 Teste dos anticorpos para uso em Co-IP:	64
IV. Discussão	68
V. Bibliografia	81

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1 UMA VISÃO GLOBAL

O desenvolvimento animal resulta da interacção entre múltiplos eventos morfogénicos e o destino celular. Ainda não se sabe ao certo como é feita a organização do destino celular, embora se saiba que resulta de modificações na regulação de genes, que é coordenada com mudanças a nível da morfologia, mudança de forma e polarização e com o movimento celular (Povelones *et al.*, 2005).

As células epiteliais são polarizadas de várias formas, que se traduz numa orientação que advém de uma distribuição intracelular desigual de proteínas. A polarização apical-basolateral (ou seja, perpendicular ao plano epitelial do tecido em questão), permite que uma determinada célula não só transporte moléculas através da camada celular – tendo como exemplos os intestinos, os rins e as várias glândulas – mas também secrete componentes da matriz extracelular de modo a formar a lâmina basal. No entanto, para correctamente desempenhar as suas funções, as células epiteliais necessitam também de ser orientadas no plano do epitélio (Jenny e Mlodzik, 2006). Esta polarização é designada de Polarização Celular num Plano (*Planar Cell Polarity* – PCP) ou polarização no tecido e, embora não esteja directamente relacionada com a *formação* de estruturas, é responsável pela *orientação* das estruturas formadas (Lawrence *et al.*, 2008) que, sem uma informação não só posicional como também vectorial, não teriam sucesso na sua função (Jenny e Mlodzik, 2006).

O resultado da sinalização da PCP engloba elementos não só intracelulares, como é o caso de uma organização coordenada de elementos do citoesqueleto; como também migrações complexas de grupos de células. Exemplos da actuação da via de sinalização da PCP em vertebrados podem ser bastante óbvios: a orientação das escamas em peixes ou das penas em aves e de pêlos nos mamíferos. Exemplos menos visíveis mas também de importância extrema – e com correlação com defeitos no desenvolvimentos – estão presentes nos cílios do órgão de Corti nos ouvidos dos vertebrados e mesmo nos movimentos celulares presentes na gastrulação. Nestes casos, qualquer aberração na actuação da via de sinalização da PCP pode

levar à surdez, no primeiro exemplo, ou a complicações no desenvolvimento embrionário, no segundo exemplo (Jenny e Mlodzik, 2006). Para além disso, há também indícios que, no caso de células cancerosas, esta via se encontra desregulada. É considerada como um possível alvo terapêutico nesses casos (Katoh, 2005; Katoh e Katoh, 2007).

Nos anos 80, pioneiros como Adler e Gubb descobriram genes que, mutados, alteravam a polaridade dos omatídeos na *Drosophila*. Rapidamente identificaram o gene *frizzled* (*fz*) e, descobriram que células *fz*⁻ repolarizavam as células *wild type* na sua vizinhança (Lawrence *et al.*, 2008). Isto indicou que qualquer interferência com a via de sinalização da PCP não influenciava apenas a célula em que a via estaria em funcionamento, mas também o grupo de células que estariam a contacto com ela, podendo assim decidir o destino de tecidos inteiros (Tree *et al.*, 2002).

Os primeiros modelos desta via de sinalização, PCP, incluíam proteínas codificadas por um pequeno grupo de genes: *prickle* (*pk*), *frizzled* (*fz*), *Van Gogh* (*Vang*) – também conhecido por *strabismus* (*stbm*) – e *dishevelled* (*dsh*). Nos anos 90, foi descoberto que, momentos antes das células se disporem de modo a formar estruturas polarizadas, algumas das proteínas codificadas por estes genes teriam uma localização preferencial num determinado pólo celular, sendo o agente inicial que permitiria essa migração era ainda desconhecido. Mais tarde, foi identificado outro gene que também estava relacionado com a via de sinalização da PCP – *flamingo* (*fmi*), também conhecido como *starry night* (*stan*) (Lawrence *et al.*, 2008).

Hoje em dia, o grupo de proteínas que são consideradas essenciais para o correcto funcionamento da via de sinalização da PCP inclui a Prickle (Pk), uma proteína com três domínios LIM e um domínio PET conservado; o receptor em serpentina Frizzled (Fz), que, para além da sua função na via de sinalização da PCP também desempenha um papel na via Wnt, como receptor de Wingless (Wg); Dishevelled (Dsh), uma proteína citoplasmática que também é partilhada nas vias de sinalização da PCP e Wnt; a proteína Diego (Dgo), que contém domínios repetidos de *Ankyrin*; Strabismus (Stbm) – também conhecida por Van Gogh (Vang) – uma proteína com quatro domínios transmembranares; e Flamingo (Fmi) – também conhecida por Starry night (Stan) – uma caderina atípica com sete domínios transmembranares (Chen *et al.*, 2008).

Para além das proteínas centrais da via de sinalização da PCP, existem outras proteínas que, sendo essenciais para esta via, não lhe são exclusivas. Incluídas neste grupo estão proteínas, como a *Pals1-associated tight junction* (Patj), que estão envolvidas na localização das proteínas da via de sinalização da PCP na extremidade apical de uma das duas faces laterais da célula (Klein e Mlodzik, 2005); proteínas, como a inversina, que aparentam controlar o equilíbrio entre a sinalização Wnt canónica e não-canónica (Simons *et al*, 2005); e proteínas, como a cinase c-Jun (JNK) e as pequenas GTPases RhoA e Rac1, que controlam as dinâmicas do citoesqueleto. Foram recentemente observados tanto em *Drosophila* como em vertebrados, *pools* intracelulares (possivelmente vesiculares) de algumas proteínas da via de sinalização da PCP – que talvez funcionem como reservatórios para a população da membrana plasmática – que sugerem que a maquinaria celular do transporte por vesículas poderá ter também um papel de suporte na via de sinalização da PCP (Shimada *et al*, 2006).

Até agora, a maior parte dos estudos realizados para tentar compreender a via de sinalização da PCP e, em particular, para desvendar as várias interacções existentes entre proteínas que formam esta cascata de sinalização têm sido realizados essencialmente em *Drosophila melanogaster*. Este modelo apresenta-se como uma boa aposta devido à versatilidade deste organismo e à facilidade de observar as consequências de uma qualquer interferência no processo. A via de sinalização da PCP está presente na *Drosophila* em várias estruturas externas de um indivíduo adulto, desde os pêlos no tórax ou nas asas até aos omatídeos que compõem os olhos da mosca. O facto de terem sido descobertos paralelismos entre a via de sinalização da PCP na *Drosophila* e em vertebrados – não só a nível das proteínas intervenientes, como também nas interacções que elas protagonizam – levam a crer que esta via é crucial para o correcto funcionamento de diversos órgãos e é, por isso, altamente conservada (Jenny e Mlodzik, 2006).

No início do desenvolvimento embrionário de *Drosophila*, Fz e Dsh migram para o lado distal da célula – um passo que foi provado ser independente do funcionamento de Pk (Tree *et al*, 2002). Por outro lado, a protocaderina Fmi distribui-se em ambas as faces, proximal e distal. No início da fase pupal, Dsh é recrutada do citoplasma para o córtex celular em resposta à sinalização de Fz/ PCP. Assim, o padrão de localização de Dsh é dependente de Fz e necessário para gerar polarização celular (Tree *et al.*, 2002).

Uma das observações mais surpreendentes e mecanisticamente mais significantes que adveio do estudo da via de sinalização da PCP em *Drosophila* centrou-se na distribuição

assimétrica de várias proteínas da via de sinalização da PCP nas faces proximal ou distal nas células epiteliais das asas e nas faces laterais num subgrupo dos fotoreceptores R3 e R4 (Wang e Nathans, 2007). Em células da pupa que vão dar origem às asas, que são mosaicos genéticos, as proteínas Dachous (Ds), Pk e Vang localizam-se na face proximal de cada célula; Dsh, Dgo, Fat (Ft) e Fz localizam-se na face distal; Starry night (Stan) localiza-se em ambas as faces; e todas estas proteínas se encontram em concentrações baixas nas restantes faces – anterior e posterior (Fig. 1). Outras experiências examinaram o efeito da via de sinalização da PCP na localização das células, através da justaposição de clones WT e mutantes; e da mutação de vários genes desta via (Klein e Mlodzik, 2005). Em conjunto com os resultados de experiências de co-imunoprecipitação de proteínas sobreexpressas da via de sinalização da PCP ou de fragmentos dessas proteínas, mostraram que várias proteínas definidas como pertencendo à via de sinalização da PCP interagem entre si directa ou indirectamente na superfície da mesma célula (em *cis*) ou com proteínas da via de sinalização da PCP na superfície de células adjacentes (em *trans*) (Wang e Nathans, 2007).

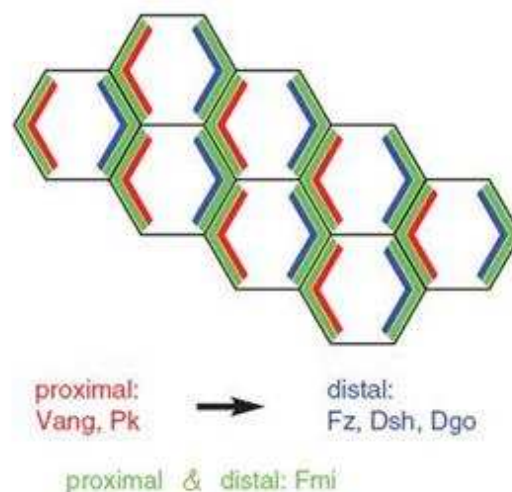


Figura 1 – Localização das proteínas centrais da via de sinalização da PCP nas faces proximal e distal das células. Estudos realizados para a localização celular de proteínas da via de sinalização da PCP sugerem que Vang e Pk se encontrem na face proximal; Fz, Dsh e Dgo na face distal e Fmi tanto na face proximal como na face distal. (Adaptado de Vladar *et al*, 2009)

Vários modelos foram entretanto propostos para a via de sinalização da PCP numa tentativa de aliar a localização das várias proteínas na célula, o *feedback loop* entre estas moléculas e a influência a montante das proteínas Fat (Ft), Dachshous (Ds) e Four-jointed (Fj).

Um desses modelos tem por base o efeito dominó, em que a localização assimétrica de complexos numa célula irá alterar a localização destes complexos numa célula adjacente através de ciclos de *feedback* dependentes de Fz. Propondo um modo de actuação intercelular, haveria uma regulação da concentração de alguns destes componentes numa região mais distal ou proximal da célula adjacente (Tree *et al*, 2002). Mais especificamente, a interacção entre Ft, Ds e Fj formaria um gradiente e esse gradiente seria de algum modo reconhecido pelas células adjacentes (Fig. 2) (Vladar *et al*, 2009). Isto baseia-se em resultados que demonstraram uma distribuição assimétrica normal de Pk em células em que *fz* e *dsh* foram mutados, quando se encontram adjacentes a células com Fz e Dsh *wild-type* (Tree *et al.*, 2002).

Assim, foi proposto um modelo que diz que quando Pk migra para o lado proximal das células, antagoniza Fz e Dsh, ligando-se ao domínio DEP de Dsh e impedindo a sua localização na face proximal e, consequentemente, a ligação desta a Fz (Tree *et al.*, 2002).

Uma acumulação de Pk na região proximal de uma célula parece ser dependente da concentração de Fz na região distal da célula adjacente. Deste modo, embora Pk não seja necessária para a activação da via de sinalização da PCP, funciona como um ciclo de *feedback*, amplificando pequenas diferenças de concentrações de Fz/ Dsh ao longo da célula, cujas consequências se vão sentir nas células vizinhas (Tree *et al.*, 2002).

Esta teoria é também comprovada pela sobreexpressão quer de Fz, quer de Pk. Sobreexpressão de Fz resulta na orientação dos pêlos da asa de *Drosophila*, na direcção das concentrações mais baixas desta proteína. Pelo contrário, com a sobreexpressão de Pk, os pêlos são reorientados de baixas para altas concentrações da proteína. Estas observações sugerem que Pk e Fz são antagonistas na via de sinalização da PCP: Pk deverá facilitar a sinalização da via bloqueando a acumulação de Fz na região proximal da célula (Tree *et al.*, 2002).

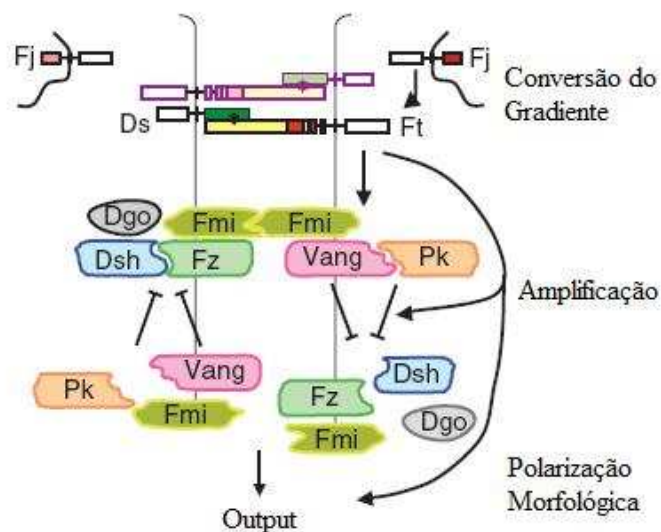


Figura 2 – Modelo da via de sinalização da PCP em 2 células adjacentes de *Drosophila*. A via de sinalização da PCP ainda não é bem conhecida em vertebrados, sendo que os modelos criados se centram no conhecimento que se obteve de estudos em *Drosophila*. Os heterodímeros de Ft e Ds apresentam uma orientação predefinida na membrana celular, resultando numa expressão graduada de Fz e Dsh. Os heterodímeros Ft-Ds orientados assimetricamente influenciam a função de um ciclo de *feedback* constituído pelas proteínas centrais da via de sinalização da PCP: Fmi, Fz, Dsh, Dgo, Vang e Pk. (Adaptado de Vladar *et al*, 2009)

Embora vários trabalhos evidenciem a importância de Fz como regulador de informação posicional, ainda não foi esclarecido qual o sinal a montante desta proteína que, de facto, potencia esta via.

Um avanço de relevo nesta área veio da descoberta de que os genes das caderinas atípicas Ft e Ds poderão controlar a via de sinalização da PCP a montante do complexo Fz/Dsh. A perda de *ft* ou *ds* resulta, em *Drosophila*, na formação dos olhos em que as orientações de omatídeos se encontram desreguladas por todo o olho, o que leva a crer que *ft* e *ds* são essenciais para a via de sinalização da PCP (Rawls *et al*, 2002; Yang *et al*, 2002). Igualmente importante, é o facto de *ft* e *ds* também funcionarem em conjunto com a via de sinalização da PCP na asa e no abdómen, sugerindo que são elementos centrais da via de sinalização da PCP (Fanto e McNeill, 2004).

Modelos alternativos admitem a presença de um Factor X que activa Fz, e outros ainda propõem a existência de um Factor Z, que seria produzido como resultado da actividade de Fz

e transmitiriam um sinal, não só na própria célula, como também para as células vizinhas. Um receptor Fz ligado produziria mais de Z do que um receptor não ligado. Por outras palavras, um gradiente de actividade de Fz é traduzido num gradiente de Z. Qualquer mutação em *pk* ou *ds* alteraria a relação entre Fz e Z e, consequente, a distribuição de proteínas na células. Quantidades anormais de Z provocariam casos de polaridade alterada em células com *pk* mutado (Adler *et al*, 2000).

A natureza deste factor Z e do seu receptor mantem-se, no entanto, desconhecida.

Interessante ainda é o facto de que a percepção desse Factor X tem mudado ao longo do tempo. No início, fora proposto que uma molécula seria produzida apenas em algumas células (as células na extremidade mais proximal da asa ou na região equatorial do olho) e teria a capacidade de se difundir num gradiente por distâncias longas. Recentemente, foram propostas teorias em que esta actividade seria devido a um factor com capacidade de difusão que seria produzido em todo o epitélio, embora em quantidades diferentes, dependendo da posição de células diferentes (Fanto *et al*, 2003).

1.2 PCP: DA *DROSOPHILA* AOS VERTEBRADOS

Considerando a quantidade e complexidade dos processos existentes na via de sinalização da PCP, assim como o grande número de proteínas intervenientes, foi elaborada uma tabela (Tabela 1) que resume os componentes conhecidos desta via, assim como as correspondências que se pensa existir entre as proteínas da via de sinalização da PCP em *Drosophila* e em Vertebrados.

Nos vertebrados, a definição do que constitui a via de sinalização da PCP ainda não está perfeitamente estabelecida. Uma definição aceite será de que a via de sinalização da PCP é qualquer processo que afecta a polaridade das células num plano epitelial e envolve um ou mais dos genes centrais da via de sinalização da PCP.

Hoje em dia, os processos de desenvolvimento que vão ao encontro desta definição são a extensão convergente, o fecho do tubo neural, o fecho da pálpebra, a orientação de cílios no ouvido e a orientação dos folículos do cabelo na pele.

Tabela 1 – Componentes da via de sinalização da PCP em *Drosophila* e Vertebrados.

Alguns dos componentes da via de sinalização da PCP em Vertebrados apresentam nomes diferentes dos de *Drosophila* ou uma proteína de *Drosophila* poderá ter correspondência com várias de Vertebrados. A tabela seguinte apresenta uma tentativa de resumir as proteínas intervenientes na via de sinalização da PCP em *Drosophila* e em Vertebrados, apresentando as respectivas correspondências. (Adaptado de Vladar *et al*, 2009)

<i>Drosophila</i>	Vertebrados
Van Gogh (Vang)/ Strabismus (Stbm)	Van Gogh-like 1 (Vangl1) Van Gogh-like 2 (Vangl2)
Prickle (Pk)	Prickle1 (Pk1) Prickle2 (Pk2)
Frizzled (Fz)	Frizzled3 (Fzd3) Frizzled6 (Fzd6) Frizzled7 (Fzd7)
Dishevelled (Dsh)	Dishevelled1 (Dvl1) Dishevelled2 (Dvl2) Dishevelled3 (Dvl3)
Flamingo (Fmi)/ Starry Night (Stan)	Celsr1 Celsr2 Celsr3
Diego (Dgo)	Inversina
Fuzzy (Fy)	Fuzzy
Inturned	Inturned
Rho1/ RhoA	RhoA
Drok	Rok/ Rock
Fat (Ft)	Fat1 Fat2 Fat3 Fat4
Dachsous (Ds)	Dachsous1 (Dchs1) Dachsous2 (Dchs2)
Four-jointed (Fj)	Fjx
Wingless (Wg)	Wnt4 Wnt5a Wnt7a Wnt11

Existem outros processos presentes tanto nos vertebrados como nos invertebrados, que envolvem os genes da via de sinalização da PCP mas nos quais a polaridade das células não está alterada e que não ocorrem na camada epitelial. Por exemplo, a mutação do gene *stan* em *Drosophila* leva ao desenvolvimento aberrante dos axónios fotoreceptores e a morfologias deficientes nas dendrites dos neurónios sensoriais no sistema nervoso periférico do embrião (Kimura *et al*, 2006). Por outro lado, o *knockdown* por RNAi de *Celsr2* (análogo de Fmi nos vertebrados), um dos três homólogos de *stan* em vertebrados, em culturas organotípicas de córtex cerebral e de cerebelo de rato leva a perda de dendrites (Wang e Nathans, 2007).

Um exemplo muito estudado da via de sinalização da PCP nos vertebrados tem a ver com a organização de cílios no ouvido. Cada cílio tem uma estrutura chamada cinocílio, formada por microtúbulos, localizada numa extremidade da célula. O cinocílio é flanqueado por estruturas, semelhantes a microvilosidades, que são ricas em actina – os estereocílios. Todos os cílios ficam alinhados, de tal modo que os cinocílios e os estereocílios apontam na mesma direcção, fornecendo à estrutura uma aparência de polaridade planar (Fanto e McNeill, 2004).

Embora há muito se pensasse que o mecanismo que leva a esta polaridade seria homólogo à via de sinalização da PCP da *Drosophila*, só recentemente foi provado que os genes envolvidos na polaridade dos cílios no ouvido são génes homólogos aos genes envolvidos na via de sinalização da PCP de *Drosophila* (Fanto e McNeill, 2004).

I.3 A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PCP NA EMBRIOGÉNESE E DIVISÃO CELULAR

Muitos dos genes da via de sinalização da PCP também estão envolvidos na extensão convergente nos embriões de vertebrados, um processo em que um determinado tecido afunila e alonga no eixo perpendicular. A extensão convergente depende do rearranjo polarizado das células. Em peixes e ratinhos, a extensão convergente é interrompida quando há mutações em qualquer um dos vários genes da via de sinalização da PCP.

Os primeiros trabalhos que mostraram que os genes envolvidos na via de sinalização da PCP também actuam na fase embrionária resulta da descoberta de que Dsh (actuando através do domínio DEP, que está implicado na sinalização PCP) é essencial para movimentos

celulares polarizados (Fanto e McNeill, 2004). Subsequentemente, outras proteínas intervenientes na via de sinalização da PCP, como é o caso de *Stbm*, foram também identificadas como essenciais para a extensão convergente (Fanto e McNeill, 2004).

A neurulação e os movimentos de tecidos que lhe estão associados são dos primeiros processos embrionários a ocorrer, e têm fascinado embriologistas há mais de um século. Em *Xenopus* e peixes, o processo começa com um alongamento e estreitamento do embrião, chamado de extensão convergente (EC). A placa neural alongada ganha um sulco central, e as margens dorsais das duas paredes desta estrutura em U acabam por se fundir e formar o tubo neural. Em humanos, a frequência com que a fusão do tubo neural não é bem sucedida é de 1 para 1000 nascimentos, sendo um dos defeitos congénitos mais comuns (Copp *et al*, 2003).

A EC reflecte a migração das células da mesoderme, movimentos que são orientados pela *lamelipodia* e pela deposição de fibras da matriz extracelular (MEC), nomeadamente de fibronectina (Goto *et al*, 2005). Em *zebrafish*, a EC pode ser interrompida por mutações nos genes *vangl2*, *prickle* ou *wnt11* (Wang e Nathans, 2007). Em *Xenopus*, a interrupção da EC pode ser obtida interferindo com qualquer uma das várias proteínas implicadas na via de sinalização da PCP; como é o caso da sobreexpressão da proteína Dsh à qual foram retirados os domínios DEP ou PDZ, que em Dsh de *Drosophila* são essenciais para que a via de sinalização da PCP ocorra (Wang e Nathans, 2007).

Em *Xenopus*, qualquer tipo de interacção com Prickle causa sérios problemas a nível da gastrulação, nomeadamente a nível da migração celular sem, no entanto, interferir com a diferenciação da mesoderme. Em todos os casos de mutações da proteína Xpk (Prickle de *Xenopus*), tanto de ganho-de-função como perda-de-função, resultou em casos de espinha bífida. Também interessantes são os dados que suportam uma ligação entre Dsh, JNK e o rearranjo dos microtúbulos através da Pk, embora este processo aparente ser mais complexo nos vertebrados, do que em *Drosophila* (Takeuchi *et al*, 2003).

Em ratinhos, casos em que se dá a perda de *Vangl2*, *Celsr1* ou *Proteína tirosina cinase 7* (*Ptk7*), ou a perda simultânea de dois ou dos três homólogos de Dsh, ou de ambos *Fz3* e *Fz6*, levam a um tubo neural completamente aberto e a um embrião de tamanho reduzido. É interessante notar que muitos dos mutantes na via de sinalização da PCP também demonstram um defeito no fecho das pálpebras. Este processo geralmente ocorre no estágio E16 de ratinho

e, tal como o fecho do tubo neural, envolve a convergência de tecidos epiteliais (Wang e Nathans, 2007).

Um passo de estreitamento e alongamento semelhante ao que ocorre na EC também ocorre durante o desenvolvimento do órgão de Corti na cóclea de mamíferos, e esta mudança de forma deixa de ocorrer em mutantes para *Vangl2*, mutantes duplos para *Dvl1* e *Dvl2* (análogos de Dsh em vertebrados), e em mutantes duplos para *Fz3* e *Fz6*, que também apresentam defeitos a nível do fecho do tubo neural (Wang *et al*, 2006; Wang e Nathans, 2007). No órgão de Corti, movimentos celulares semelhantes aos que ocorrem na EC dão-se após a multiplicação dos precursores neurosensoriais por mitose, indicando que este processo é independente da divisão celular orientada, mas possivelmente regulado pela via de sinalização da PCP (Wang, J. *et al*, 2006).

É interessante o facto de que, embora estes exemplos de migração celular impliquem sobretudo a actividade de cada célula individualmente; o tecido inteiro migra como uma unidade. Isto sugere que a sinalização da via de sinalização da PCP envolve algum tipo de interacção entre células que lhes confere uma identidade colectiva. O resultado será de um tecido organizado, com a capacidade de actuar como uma entidade única, quer esse tecido migre ou forme uma estrutura planar organizada.

Aliás, a divisão simétrica ou assimétrica das células e a sua posterior migração, são fenómenos comuns durante o desenvolvimento embrionário, e a sua dependência da via de sinalização da PCP não é surpreendente. Divisões celulares orientadas ou assimétricas dependem da posição do plano de clivagem, resultando em células-filhas com uma determinada orientação ou com tamanhos e conteúdos proteicos desiguais (Vladar *et al*, 2009). As dinâmicas do citoesqueleto formam o cerne da orientação do fuso mitótico e a geração de um plano de clivagem durante a divisão celular (Vladar *et al*, 2009). Como a via de sinalização da PCP é um conhecido modelador de elementos do citoesqueleto noutros sistemas de polarização, é provável que também esteja envolvido na divisão celular.

I.4 A COMPLEXIDADE DO OUVIDO E A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PCP

O ouvido de um vertebrado é uma maravilha arquitectónica, em que ossos, vasos sanguíneos, câmaras com líquido no seu interior, células de suporte, neurónios sensoriais, depósitos extracelulares especializados e axónios estão todos arrançados com uma precisão extraordinária. Existem três tipos de células epiteliais sensoriais no ouvido: o órgão de Corti, que detecta vibrações no ar (i.e. o som) e que as converte em movimento dentro da cavidade central da cóclea; o utrículo e o sáculo, que detectam a aceleração linear através dos movimentos no espaço extracelular de cristais de cálcio (otólitos); e a *crista ampullaris*, que detecta a aceleração angular através do movimento de fluidos em três giroscópios microscópicos designados de canais semicirculares. Dada a complexidade do ouvido, não é surpreendente que os principais sistemas de sinalização utilizados durante o desenvolvimento embrionário nos vertebrados, também sejam importantes para o desenvolvimento do ouvido, incluindo os sistemas do ácido retinóico, Hedgehog, Notch, Neurotrofina, Bone Morphogenetic Proteins (BMP), Wnt e Fibroblast Growth Factor (FGF) (Wang e Nathans, 2007).

A precisão estrutural do ouvido é reiterada do ponto de vista subcelular. Em particular, cada neurónio sensorial primário desenvolve na sua face apical uma série de estereocílios, principalmente compostos por actina, adjacentes a um único cílio verdadeiro, o cinocílio. Esta estrutura mecanosensorial está orientada de uma forma específica em relação ao plano do epitélio. A orientação dos cílios confere-lhes uma selectividade direcciona na resposta mecânica da célula: a deflecção dos cílios na direcção do cinocílio abre canais de protões na membrana plasmática; a deflecção dos cílios na direcção oposta do cinocílio fecha estes canais; e a deflecção em qualquer outro sentido não tem qualquer efeito. Vistos de cima, os estereocílios das células cocleares estão orientados de maneira a formar um V, com o cinocílio localizado na ponta do V. Os estereocílios das células vestibulares (as que fazem parte dos utrículo, sáculo e *crista*) estão arrançados num grupo denso, com o cinocílio num dos lados desse grupo. Em todos os conjuntos de cílios, o comprimento dos estereocílios varia de tal modo que os estereocílios mais compridos são aqueles que estão mais perto do cinocílio e os mais curtos são os que estão mais afastados do cinocílio.

Há alguns anos atrás, foi proposto que os sinais da via de sinalização da PCP permitiriam orientar estes grupos de cílios no plano do epitélio sensorial do ouvido. Mais

tarde, foi observado que mutações em *Celsr1* e *Vangl2*, ambos componentes da via de sinalização da PCP em vertebrados, produzem desarranjo na orientação dos cílios do epitélio sensorial do ouvido (Curtin *et al*, 2003; Montcouquiol *et al*, 2003). Defeitos na orientação dos cílios no órgão de Corti foram posteriormente descritos em ratinhos *knockout* para *Ptk7* ou duplos *knockout* em *Dvl1* e *Dvl2* ou *Fz3* e *Fz6* (Wang *et al*, 2006). A severidade dos defeitos e os grupos de cílios afetados variam com os diferentes genes que são mutados. Algumas dessas diferenças poderão ser um reflexo da participação de proteínas de uma mesma família, que têm uma função redundante. Muitos genes de mamíferos que participam na via de sinalização da PCP fazem parte de famílias pequenas e homólogas. Por exemplo, *Fz3* e *Fz6* aparentam ter funções completamente redundantes no fecho do tubo neural (Wang *et al*, 2006). Em ensaios realizados com os cílios do sistema vestibular, a perda de *Vangl2* criou desordem na orientação dos cílios tanto no utrículo como na *crista* (Wang *et al*, 2006).

Para além da sua importância no contexto da audição e equilíbrio, o epitélio sensorial do ouvido apresenta-se como um poderoso sistema para estudar a via de sinalização da PCP nos vertebrados. Hoje em dia, é o único local onde os fenótipos da via de sinalização da PCP de mamíferos podem ser analisados quantitativamente com uma resolução a nível celular. Este sistema continua a ser estudado para determinar a localização subcelular de proteínas da via de sinalização da PCP em vertebrados e o efeito de mutações em genes da via de sinalização da PCP na localização dessas proteínas.

I.5 UMA QUESTÃO DE NERVOS: A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PCP E O DESENVOLVIMENTO NEURONAL

Embora o desenvolvimento dos neurónios e das células epiteliais não partilhem necessariamente os mesmos mecanismos da via de sinalização da PCP, a descoberta de componentes desta via em ambos os contextos sugere que, a um nível molecular, estes processos poderão estar relacionados, pelo menos parcialmente.

Em mamíferos, um dos fenótipos mais dramáticos identificados até agora, do crescimento e orientação de axónios foi observado em ratinhos sem *Fz3* ou *Celsr3*, que são homólogos de genes principais da via de sinalização da PCP em *Drosophila* frizzled e flamingo/ starry night, respectivamente. A perda de qualquer um destes genes elimina ou

encurta os axónios que ligam o tálamo ao córtex, e resulta em axónios sensoriais da medula espinal com incorrecto desenvolvimento morfológico. Em ambos os mutantes, a proliferação e migração de neurónios para o prosencéfalo não são afectadas (Wang e Nathans, 2007).

I.6 A ORIENTAÇÃO DE PÊLOS: *DROSOPHILA* E VERTEBRADOS

O fenómeno da via de sinalização da PCP em mamíferos que mais se assemelha à orientação de pêlos na *Drosophila* é o arranjo regular e paralelo de pêlos na superfície da pele. Os folículos capilares fazem um ângulo agudo em relação à pele, e por isso cada folículo e o seu pêlo associado tem uma orientação bem definida em relação aos eixos do corpo. A diferença principal entre os folículos capilares de mamíferos e os pêlos de *Drosophila* está na escala: em *Drosophila*, cada célula epitelial da asa tem uma única protuberância rica em actina (o pêlo); enquanto que cada folículo capilar de mamífero é composto de centenas de células e está separado de folículos vizinhos por um diâmetro de dezenas de células. No geral, a orientação de cada folículo assemelha-se à orientação média dos seus vizinhos. Este arranjo regular não está presente em ratinhos *Fz6^{-/-}*, à semelhança do que acontece aos pêlos das asas de *Drosophila* em mutantes para a via de sinalização da PCP (Fig. 3): o padrão está globalmente desordenado, mas localmente ordenado, dando origem a ondas e remoinhos, cada um composto por dezenas a centenas de elementos (Guo *et al*, 2004).

Uma análise recente à pele durante o desenvolvimento embrionário tardio e o desenvolvimento pós-natal precoce mostrou que, em WT e *Fz6^{-/-}*, os padrões do pêlo são originados por um processo de auto-organização de folículos capilares que se encontram inicialmente orientados aleatoriamente. A auto-organização de folículos capilares depende do gene *Fz6*. Esta análise demonstrou também que os folículos capilares de mamíferos, embora sejam de tamanho elevado, possuem uma plasticidade inesperada, reorientando-se em resposta aos estímulos circundantes em poucos dias. Os dados indicam que *Fz6* normalmente actua em estádios mais iniciais do desenvolvimento, estabelecendo uma orientação global dos folículos capilares em relação aos eixos do corpo. A subsequente reorientação é orquestrada por um sistema independente de *Fz6* que alinha os folículos vizinhos. Ou seja, parece haver dois sistemas distintos de orientação, um que actua de forma global nos estádios iniciais do

desenvolvimento, e um segundo que actua mais tarde e de forma localizada (Wang e Nathans, 2007).

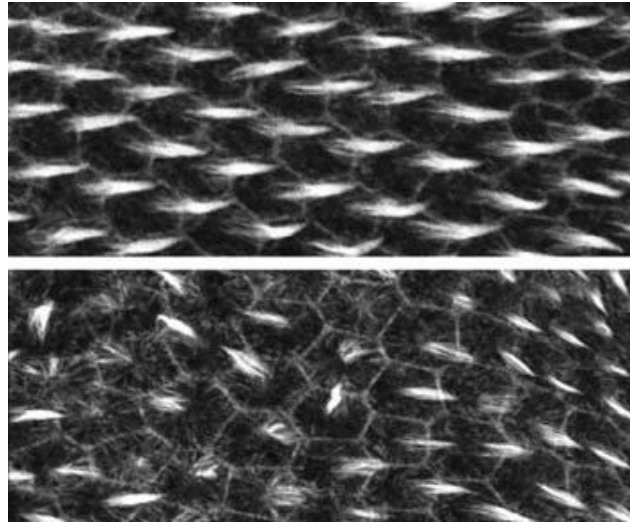


Figura 3 – Orientação dos pêlos na asa de *Drosophila*. Imagens da asa de *Drosophila* na fase pupal. Em cima, pêlos com orientação correcta. Em baixo, células mutantes para a via de sinalização da PCP. As alterações que são verificadas quando a via de sinalização da PCP se encontra desregulada são bastante evidentes. (Adaptado de Vladar *et al*, 2009)

A existência de um mecanismo de refinamento local permite que o sinal global produza apenas um alinhamento geral dos folículos não-maturos. Em ratinhos WT, o mecanismo local refina as orientações imperfeitas dos folículos de forma eficiente, de modo a que resultem folículos orientados de forma quase perfeitamente paralela.

Este modelo bifásico também foi proposto em termos da sinalização da via de sinalização da PCP em *Drosophila*, embora não esteja completamente estabelecido que os processos dependentes de Fz e independentes de Fz observados em *Drosophila* sejam análogos aos que definiram o fenótipo $Fz6^{-/-}$ dos folículos capilares. Na verdade, a concepção geral é que os sistemas de Ds, Ft e Fj actuam a montante, de forma a estabelecerem uma orientação global, e que os sistemas Fz, Vang, Dsh e Stan actuem a jusante de modo a refinar essa orientação; e que a padronização dos fenótipos em mutantes $Fz6^{-/-}$ parece seguir esse

modelo. Poderão existir outros mecanismos que sigam modelos bifásicos no contexto de processos da via de sinalização da PCP em vertebrados. Por exemplo, o refinamento progressivo da orientação dos cílios no ouvido, um fenómeno observado tanto nos mamíferos como nas aves (Dabdoub *et al*, 2003), é consistente com um processo bifásico (Wang e Nathans, 2007).

Os estudos de localização de proteínas da via de sinalização da PCP em vertebrados estão ainda no início. Tal como em *Drosophila*, os complexos de proteínas da via de sinalização da PCP acumulam-se na extremidade apical das faces laterais das células epiteliais. No ouvido da galinha, *Celsr1* localiza-se assimetricamente tanto nas células que formam os cílios como nas células de suporte do epitélio sensorial (Davies *et al*, 2005). No órgão de Corti do ratinho, a proteína *Dvl2* localiza-se assimetricamente na superfície das células que formam os cílios e das células de suporte, e esta localização é perdida em mutantes *Vangl2* (Wang, J. *et al*, 2006). De uma forma semelhante, *Fz3* e *Fz6* colocalizam-se assimetricamente na superfície de células que formam os cílios e de células de suporte em todo o epitélio sensorial do ouvido, e esta localização é mais uma vez perdida em mutantes *Vangl2* (Wang *et al*, 2006). A formação de complexos pelas proteínas da via de sinalização da PCP aparenta ser altamente sensível à orientação dos lados da célula em relação ao eixo global do epitélio (Wang e Nathans, 2007).

I.7 A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PCP E O CANCRO

Com o estudo continuado da via de sinalização da PCP, foi possível estabelecer algumas ligações entre esta via e o desenvolvimento embrionário e a formação de tecidos (Wang e Steinberis, 2009). Interessante é o facto de que o desenvolvimento embrionário partilha muitos mecanismos com o desenvolvimento do cancro (Wang, 2009).

Na verdade, vias de sinalização conservadas envolvidas na embriogénese, incluindo as vias Wnt, Hedgehog e Notch estão desreguladas na tumorigénese, o que mais uma vez evidencia a teoria de que o cancro será uma manifestação descontrolada do desenvolvimento (Kho *et al*, 2004). Embora a via canónica de sinalização Wnt/ β -catenina tenha vindo a ganhar reconhecimento como sendo um elemento fulcral na tumorigénese e tenha sido proposta como

um possível alvo terapêutico, há cada vez mais dados que indicam que a via de sinalização da PCP está associada ao desenvolvimento do cancro (Wang, 2009).

A ocorrência de metástases está na origem da grande maioria das mortes relacionadas com o cancro. À medida que os tumores progridem, as células cancerosas desenvolvem a capacidade de invadir os tecidos circundantes e formar tumores secundários em locais distintos do primário. A formação de metástases é constituída por uma série de processos discretos. Um melhor conhecimento sobre a base molecular de formação das metástases é de importância vital para a criação de uma terapia orientada e eficaz (Steeg, 2006). Embora os mecanismos envolvidos ainda não tenham sido completamente desvendados, é geralmente aceite que os factores associados com a aderência e migração celular estão na base da invasão tumoral e do desenvolvimento de metástases. Dado o papel central da sinalização da via de sinalização da PCP na modelação da aderência e mobilidade celulares em diversos contextos de desenvolvimento morfogénético, não será surpreendente que esteja também implicada na formação de metástases, resultantes de uma via de sinalização da PCP desregulada (Wang, 2009).

Recentemente identificaram-se uma variedade de componentes e moduladores da via de sinalização da PCP envolvidas na formação de metástases (Wang, 2009). Temos, por exemplo, a proteína Wnt5a, que é uma Wnt não-canónica, que, na maioria dos casos, activa vias de sinalização independentes de β -catenina embora, dependendo do contexto em que se encontre o receptor, também possa activar a via da sinalização da β -catenina. Já se demonstrou que Wnt5a promove metástases de melanoma, cancro gástrico e cancro da mama, ao activar Rac e JNK (Kurayoshi *et al*, 2006; Pukrop *et al*, 2006). De entre os 10 membros da família do gene Frizzled (Fzd), Fzd7 é único, na medida em que consegue activar diferentes vias da sinalização Wnt. Em *Xenopus*, Fzd7 consegue activar a sinalização da via Wnt não-canónica na morfogénese, e a sinalização PCP mediada por Fzd7 regula os movimentos celulares através da activação de JNK e Rho (Medina *et al*, 2000). Na galinha, Fzd7 também influencia a sinalização PCP para controlar a morfogénese óssea (Wang, 2009). Em humanos, Fzd7 promove a migração das células do carcinoma hepatocelular e a invasão das células de cancro do cólon, que aparentam ser mediadas pela sinalização Wnt não-canónica (Wang, 2009). Recentemente, foi demonstrado que Fzd10 tem um papel crítico nas metástases do sarcoma sinovial. Mecanicamente, Fzd10 activa o eixo Dvl-Rac1-JNK da via de sinalização da PCP, sem exercer qualquer efeito na acumulação nuclear de β -catenina, nem na actividade

do repórter Tcf/Lef (Wang, 2009). A jusante de Fzd, três membros da família Dvl (Dvl1, Dvl2 e Dvl3) foram identificados em humanos. Um estudo recente cujo objectivo era averiguar o significado clínico da expressão das proteínas Dvl em carcinoma pulmonar de células não-pequenas (CPCNP), mostrou que a expressão de Dvl1 e Dvl3 eram significativamente superiores em metástases nodais relativamente às células do tumor primário. Curiosamente, embora haja correlação entre a expressão de Dvl1 e a expressão de β -cateninas em metástases, não se conhece qualquer ligação entre a expressão de Dvl3 e de β -cateninas em tumores primários ou metástases. Corroborando estes dados histológicos, a expressão exógena de Dvl1 e Dvl3 promove a capacidade invasiva de células cancerosas do pulmão mas tem um efeito diferencial nos níveis de β -catenina (Wang, 2009). Isto sugere que as metástases de CPCNP podem ser mediadas não só por Dvl1, através da via canónica de Wnt, como também por Dvl3, numa maneira independente de Wnt. São necessários mais estudos para poder afirmar se a influência de Dvl3 em metástases se processa através da via de sinalização da PCP, ou de outra via Wnt não-canónica, como é o caso da via Wnt/ Ca^{2+} (Wang, 2009).

A supressão da expressão de Vangl1 inibe o crescimento do carcinoma hepatocelular (Midorikawa *et al*, 2007). Esta proteína transmembranar promove metástases no cólon e no epitélio pavimentoso, e a sua expressão está aumentada nos tumores da mucosa e em tecidos metastáticos de pacientes com cancro gástrico (Wang, 2009). Para além disso, a inibição de Vangl1 por siRNA suprime o aparecimento de metástases em ratinhos com cancro do cólon, confirmando o papel de promoção de formação de metástases por parte de Vangl1 (Lee *et al*, 2005). Esta proteína promove também a migração e invasão celular em casos de cancro colorectal, ao formar um complexo funcional com Dvl e *Protein Kinase C δ* (PKC δ) para modular a mobilidade celular (Wang, 2009). Este estudo sugere que, ao ser estimulada a produção de Vangl1, a sinalização da via de sinalização da PCP é alterada, de modo a promover a invasão tumoral e o aparecimento de metástases.

Os receptores de efráinas Eph compõem a maior família de receptores de cinases de tirosinas. Os seus ligandos, as efráinas, são proteínas ancoradas à membrana e são classificadas como a efráinaA ancorada ao glicosilfosfatidilinositol e a efráinaB transmembranar. A via de sinalização Eph/efráinas tem um papel crítico, não só no desenvolvimento embrionário, como também na homeostase de órgão adultos ao regular vários processos celulares como a aderência versus a repulsão, mobilidade e migração e a comunicação intercelular (Pasquale, 2008). Isto pode, em parte, ser devido à característica

única do sistema Eph/efraína de iniciar uma via de sinalização bidireccional que abrange, não só as células que expressam o receptor Eph, como também aquelas que expressam o ligando efraína. Em particular, a sinalização reversa que é despoletada, através do domínio de ligação a PDZ que se encontra na extremidade C-terminal da efraínaB, e que permite regular a interacção desta proteína com outras que afectam a organização do citoesqueleto e a aderência celular (Surawska *et al*, 2004). Os membros da família da efraínaB encontram-se, muitas vezes, sobreexpressos em células cancerosas e estão associados com a angiogénese e com as metástases (Campbell e Robbins, 2008). Estudos recentes revelaram que o domínio intracelular da efraínaB1 interage com Dvl, modulando assim a via de sinalização da PCP e controlando a aderência celular e o movimento celular durante o desenvolvimento (Wang, 2009). Estes resultados abrem novas possibilidades de estudo da interacção entre a efraínaB e a via de sinalização da PCP, no contexto da invasão de células tumorais e de metástases.

A formação de novos vasos sanguíneos – a angiogénese – é essencial, não só para o crescimento de tumores primários, como também de metástases. A angiogénese facilita o aparecimento de metástases ao aumentar o número de células tumorais que entram na circulação sanguínea e providenciando nutrientes e oxigénio para os locais de crescimento de metástases. A angiogénese é um processo complexo, que envolve a proliferação de células endoteliais, assim como uma série de passos em que as células endoteliais se dividem, invadem a lâmina basal, migram e, por fim, são diferenciadas e participam na formação de capilares (Steeg, 2006). As proteínas Wnt surgiram como uma nova classe de factores angiogénicos, promovendo este processo, e dados recentes indicam que tanto a sinalização Wnt/ β -cateninas, como nas vias Wnt não-canónicas, estão envolvidas na angiogénese (Maskauchán e Kitajewski, 2006). Usando ensaios genéticos, a fumagilina, que é um potente producto antiangiogénico natural, foi identificada como inibidor específico da sinalização Wnt não-canónica, o que sugere uma ligação entre as vias Wnt não-canónicas e a angiogénese. Outros estudos demonstraram que a inibição da via de sinalização da PCP por um análogo da fumagilina, o TNP-470, perturba o crescimento, polaridade e migração das células do endotélio (Zhang *et al*, 2006). Para além disso, em *zebrafish* mutantes para Wnt5, a via de sinalização da PCP é deficiente e observam-se várias alterações morfológicas como vasos intersegmentais malformados, aortas dorsais reduzidas e veias cardinais posteriores também reduzidas (Cirone *et al*, 2008; Zerlin *et al*, 2008). Todos estes resultados apoiam o papel emergente da via de sinalização da PCP na angiogénese.

No entanto, o papel da via de sinalização da PCP na invasão tumoral, no aparecimento das metástases e na angiogénese é ainda controverso.

Se de facto a via de sinalização da PCP estiver envolvida na tumorigénese, a sua supressão também seria capaz de suprimir a tumorigénese e, de facto, existem dados que comprovam que vários dos componentes da via de sinalização da PCP conseguem suprimir a progressão tumoral, incluindo membros da família das protocaderinas como Fat, Dachshous e a Protocaderina Paraxial (PAPC). Embora tenha sido proposto um modelo em que Fat e Dachshous actuam como supressores de tumores ao interagirem com redes de sinalização a jusante para regular a transcrição e o crescimento celular (Veeman *et al*, 2003; Reddy e Irvine, 2008), a extensão pela qual o controlo da polaridade celular por Fat está envolvido com a supressão de tumores é ainda uma questão em aberto.

O gene *wnt5a* actua quer como um oncogene, quer como gene supressor de tumores, dependendo do contexto em que vai actuar. Se por um lado *Wnt5a* pode ter função de supressão tumoral ao antagonizar a sinalização *Wnt*/ β -catenina, noutros contextos, particularmente em situações de cancro num estágio mais avançado, *Wnt5a* está em concentrações mais elevadas e tem as propriedades oncogénicas de promover a invasão tumoral, o aparecimento de metástases e a angiogénese (Wang, 2009), como foi referido anteriormente. Neste aspecto, a via de sinalização da PCP é análoga à do *Transforming Growth Factor β* (TGF β), no que diz respeito aos vários papeis que este factor tem no desenvolvimento do cancro com efeitos iniciais de supressão, através da inibição do crescimento, e efeitos mais tardios tumorigénicos, incluindo o aumento da mobilidade das células tumorais e posterior invasão destas e de indução da angiogénese (Akhurst e Derynck, 2001). É então tentador propor um modelo em que a sinalização da via de sinalização da PCP tem um papel bifásico na carcinogénese, ao actuar como um supressor nos estádios iniciais, mas evoluindo para um estimulador da invasão tumoral, metástases e angiogénese nos estádios mais tardios.

Estes conhecimentos permitem desenvolver novos meios de diagnóstico e novas terapias no combate ao cancro, usando como base a via de sinalização da PCP.

Aliás, alguns dos componentes da via de sinalização da PCP, como é o caso de *Vangl1* e *EfrinaB*, apresentam potencial como biomarcadores de diagnóstico para tumores metastáticos em fase avançada, dado que os seus níveis de expressão são mais elevados nos

tumores malignos e estão correlacionados com taxas de sobrevivência inferiores. Para além disso, a inibição de moléculas da via de sinalização da PCP, como Vangl1 por siRNA poderá suprimir a progressão do cancro do cólon e do aparecimento de metástases; apresentando-se como uma nova terapêutica que pode ser direccionada a um componente da via de sinalização da PCP em particular (Wang, 2009). Outra vantagem advém do facto de que a via de sinalização da PCP funciona sobretudo na morfogénese embrionária, enquanto que a via Wnt/ β -catenina detém um papel fisiológico crucial não só no desenvolvimento embrionário, como também na homeostase de tecidos adultos, sendo por isso menos específica e menos apropriada para mercador de células cancerosas. Por outras palavras, a modulação da via de sinalização da PCP em pacientes com cancro é menos provável de interferir com a homeostase, apresentando-se como uma melhor solução na terapia oncológica (Wang, 2009).

De qualquer modo, há ainda muitas questões em aberto que dificultam o estabelecimento de um eficiente plano terapêutico direccionado à via de sinalização da PCP. Em primeiro lugar, na via de sinalização Wnt/ β -catenina já foi criado um sistema que identifica pequenos complexos moleculares que interagem com esta via (Wang, 2009). Esse sistema ainda não existe na via de sinalização da PCP, problema que é devido, em parte, pelo facto da via em si ainda não estar completamente descrita, pelo menos em vertebrados. Em segundo lugar, os intervenientes da via de sinalização da PCP apresentam uma variedade de funções. Por exemplo, a proteína Fat tem uma função de supressão tumoral que resulta da regulação da transcrição e do crescimento celular, e esta função não se encontra relacionada com a via de sinalização da PCP. Não há dúvida que se apresentaria como uma grande vantagem, para pacientes com cancro, uma terapêutica que conseguisse alterar os efeitos a jusante de Fat na via de sinalização da PCP, preservando, ao mesmo tempo, a sua função de supressão tumoral. Em terceiro lugar, os tumores têm a capacidade de adquirir resistência a várias terapêuticas, sendo que uma terapia combinada seria provavelmente necessária. É conhecido que a via de sinalização da PCP tem ligações e consegue influenciar outras vias, incluindo a via Wnt/ β -catenina canónica, a sinalização de proteínas morfogénicas dos ossos (BMP) e a sinalização para factor de crescimento dos fibroblastos (FGF), que regulam a morfogénese embrionária (Wang e Steinbeisser, 2009). É necessário investigar essas ligações no contexto do desenvolvimento do cancro de modo a desenvolver estratégias terapêuticas novas no combate ao cancro.

É muito provável que, nos anos que se seguem, a investigação do papel desta via no cancro aumente, providenciando uma nova frente de combate no tratamento do cancro.

I.8 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA PRICKLE

Prickle é uma proteína que contém um motivo CYS N-terminal seguido de um motivo PET, três motivos LIM e um motivo PkH na posição C-terminal (Fig. 4) (Katoh e Katoh, 2003; Cooper *et al*, 2008). Estes dados foram obtidos em estudo das proteínas da família PET, na qual a Prickle se insere. Outras proteínas que fazem parte desta família são a Testina (Tes) e a LMCD1/Dixina. Assim, a proteína Prickle foi caracterizada por estudos de homologia com as outras proteínas desta família (Bekman e Henrique, 2002). Os domínios LIM (Lin-11 Isl-1 Mec-3; InterProaccession IPR001781) são ricos em cisteínas e geralmente estão implicados em interacções entre proteínas, devido a domínios de ligação de zinco (Michelsen *et al*, 1993; Dawid *et al*, 1998; Gubb *et al*, 1999). Há indícios que sugerem que a existência de motivos LIM é uma forte indicação de que uma determinada proteína se pode associar tanto aos microfilamentos de actina do citoesqueleto como à maquinaria transcricional da célula (Kadrmaz e Beckerle, 2004). O domínio N-terminal PET funciona em conjunto com os três domínios LIM aquando da interacção com outras proteínas (Gubb *et al*, 1999). O domínio PkH contém um local CaaX de prenilação que determina interacções proteína-proteína e proteína-membrana (Desnoyers e Seabra, 1998; Maurer-Stroh *et al*, 2003). Estudos bioquímicos e de mutagénese demonstraram que este local regula a localização da Prickle no núcleo (Shimojo e Hersh, 2003, 2006; Veeman *et al*, 2003).

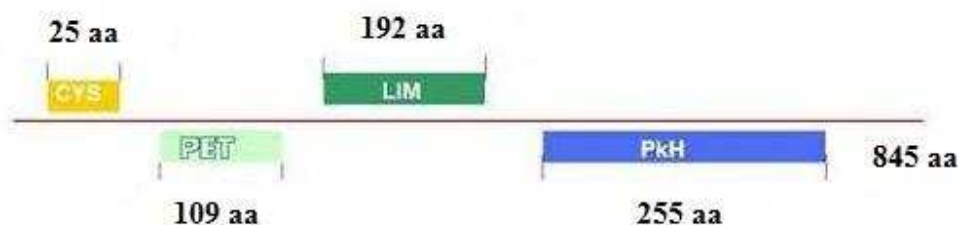


Figura 4 – Representação esquemática da proteína Prickle com os seus domínios evidenciados. Também estão indicados os tamanhos dos domínios e da proteína completa (em aminoácidos – aa).

Os domínios LIM e PET da Prickle têm sido muito estudados.

O domínio LIM, para além de mediar a ligação entre proteínas, como descrito anteriormente, tem também a capacidade de se ligar directamente a microfilamentos de actina que compõem o citoesqueleto (Khurana *et al*, 2002). De facto, células mutadas de modo a não expressarem esta proteína apresentam defeitos a nível do citoesqueleto. Em *Dictyostelium*, a perda de proteínas Lim – compostas apenas por domínios LIM – causam a perda de polarização celular, aparecendo pseudópodes laterais, para além do pseudópode principal (Titus *et al*, 1993; Zhang *et al*, 2002). Essas proteínas Lim, devido ao seu domínio LIM, actuam juntamente com os microfilamentos de actina do citoesqueleto, modelando a resposta quimotáctica durante o desenvolvimento inicial e contribuem para a manutenção da integridade do citoesqueleto de actina (Khurana *et al*, 2002).

O domínio PET está presente em, pelo menos três outros genes em vertebrados, formando assim uma família de proteínas, todas elas com características semelhantes: Testina, Dixina e Espinas. Embora haja alguma variação entre elas (nomeadamente, no número de domínios LIM que cada uma contém – a Prickle e a Testina possuem três domínios LIM enquanto que a Dixina possui apenas dois), todas elas possuem o domínio PET conservado (Bekman e Henrique, 2002).

Embora ainda não se saiba em concreto qual a estrutura do domínio PET ou como é que, através deste domínio, a proteína Prickle interage com outros componentes celulares, estudos recentes forneceram alguns dados de relevo que, de certo modo, ajudam a desvendar qual o papel desta proteína e como é processada a sua função.

Assim, através de ensaios bioquímicos e de espectroscopia, incluindo cromatografia de exclusão de massa, espectrometria de massa, *cross-linking* químico e cálculos de hidrodinâmica, chegou-se à conclusão de que este domínio seria monomérico com uma conformação não-globular e com propriedades de proteínas intrinsecamente desordenadas (Sweede *et al*, 2008).

Mais interessante ainda é o facto de os resultados indicarem que existem interacções entre o domínio PET e os três domínios LIM dentro da mesma proteína, de tal modo que os domínios LIM podem contribuir para a função da Prickle ao promover a interacção intramolecular com outras proteínas (Kadmas e Beckerle, 2004). Foram observados resultados semelhantes com um homólogo da Pk, a Testina (Tes), que também ela contém um

domínio PET e três domínios LIM, com as interações entre estes domínios ocorrendo em condições *in vitro* e *in vivo* (Garvalov *et al*, 2003). Embora seja ainda hipotético, foi proposto um modelo em que a regulação de Pk é efectuada através da mudança conformacional entre um estado “aberto”, onde PET e LIM não interagem; e um estado “fechado”, em que os domínios LIM modulam a interacção, com a membrana celular, do domínio PET (Fig. 5) (Sweede *et al*, 2008). Este modelo poderá explicar a localização preferencial de Pk numa face da célula, quando inserida na via de sinalização da PCP.

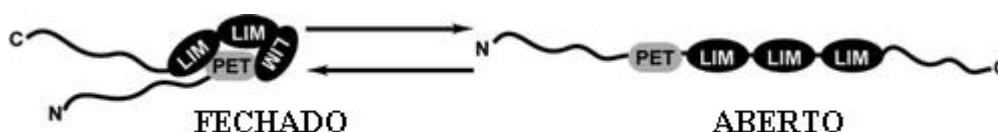


Figura 5 – Modelo para a mudança conformacional da proteína Prickle. O modelo assume uma mudança conformacional da proteína Prickle que advém da interacção dos três domínios LIM com o domínio PET, resultando numa estrutura “aberta” ou “fechada”. Esta mudança conformacional vai-se reprecutir nas interacções que Prickle estabelece com outras proteínas através do domínio PET. (Adaptado de Sweede *et al*, 2008)

I.9 OBJECTIVO

O estudo da via de sinalização da PCP no nosso laboratório visa confirmar possíveis interacções da proteína Prickle com outras proteínas que estejam relacionadas com a via de sinalização da PCP. Foram identificadas previamente possíveis candidatas, usando a técnica de duplo híbrido do rastreio de um banco de cDNA de embriões de ratinho com 17 dias.

Neste trabalho utilizámos técnicas bioquímicas para validar as interacções entre Prickle e as proteínas identificadas previamente. A estratégia seguida passou pela expressão, em sistema bacteriano de *Escherichia coli*, das proteínas que interagem. As bactérias já tinham sido transformadas de modo a expressarem fusões das proteínas identificadas pelo sistema de duplo híbrido como interagindo com Prickle (His₆-Rock1, His₆-Pias3, His₆-Freud-1 e His₆-Myak-S) como os fragmentos da Prickle em fusão com o enzima Glutathione S-transferase (GST-F1 e GST-F2) e também o enzima Glutathione S-Transferase sem estar em

fusão; fazer ensaios de GST pull-down e analisar os resultados em Western Blot. Por fim, foram feitos testes com anticorpos para podermos realizar ensaios de co-imunoprecipitação.

Previamente ao trabalho aqui apresentado, no nosso laboratório foram utilizados quatro fragmentos da proteína Prickle2 para rastreio do banco de cDNA de embriões de ratinho com 17 dias: F1, correspondendo ao domínio CYS; F2, correspondendo ao domínio PET; F3, correspondente ao domínio LIM e F4, correspondente ao domínio PkH. Os testes prévios com os fragmentos F3 e F4 mostraram que estes fragmentos activaram inespecificamente o sistema de duplo híbrido. Quando o fragmento F1 foi utilizado para rastreio do banco de cDNA de ratinho obtiveram-se clones positivos (contêm plasmídeos que codificam uma proteína que interage com Prickle) mas testes posteriores mostraram que as interações eram inespecíficas e os estudos foram descontinuados.

O rastreio do banco de cDNA de embrião de ratinho com o fragmento F2, o domínio PET da proteína Prickle, permitiu identificar vários clones positivos, alguns com genes repetidos. Estes clones continham plasmídeos com fragmentos dos genes que codificam as proteínas Rock1, Pias3, Freud-1 e Myak-S, identificadas por homologia com um banco de dados de proteínas humanas e de *Mus musculus*.

No caso de Pias3, os clones obtidos tinham fragmentos diferentes. Foram isolados 8 clones. Sete desses clones eram exactamente iguais entre si. O restante não continha os 663pb iniciais. Pias3 humana partilha 83% de homologia com a Pias3 de ratinho.

Isolaram-se os plasmídeos contendo estes genes e foram posteriormente introduzidos em leveduras, simultaneamente com os plasmídeos contendo os fragmentos de Prickle, para confirmar a validade das interações proteicas. Confirmaram-se interacção positivas entre F2 e as seguintes proteínas:

Rock1 (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*) é uma proteína de serina/treonina, intracelular, que se encontra associada microtúbulos (Phillips *et al*, 2005), inserida na família das Rho GTPases, família essa que engloba proteínas que já foram caracterizadas como desempenhando funções de aderência, mobilidade, proliferação, diferenciação e apoptose celulares (Shi e Wei, 2007), assim como associadas à contracção do músculo liso, organização do citoesqueleto de actina e expressão génica (Noma *et al*, 2006).

Esta proteína é de interesse elevado para o nosso estudo porque já foi referido o seu envolvimento na polaridade celular num plano (Phillips *et al*, 2005). Foi também identificado o seu papel na migração celular (Nakamura *et al*, 2001) e, através da sua interacção com a cinase LIM, consegue remodelar o citoesqueleto de actina (Maekawa *et al*, 1999). Interage genericamente com Dsh, Fz, Spaghetti Squash (Sqh), Zipper-Interacting Protein (Zip) e Moe. RhoA e Rock1 são mediadores da via de sinalização do PCP (Phillips *et al*, 2005).

Pias3 (*protein inhibitor of activated STAT3*) é uma proteína nuclear SUMO ligase, que pertence a uma família de proteínas que se pensa que possam interagir com mais de 60 proteínas (Shuai, 2006). Pias3 interage com *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) e com *microphthalmia transcription factor* (MITF) inibindo a actividade de ligação ao DNA destes dois factores (Levy *et al*, 2002).

Freud-1 (*Five repressor element under dual repression binding protein-1*) também conhecida como coiled-coil and C2 domain containing 1A (CC2D1A) é uma proteína nuclear que apresenta dois domínios: domínio C2 – região conservada 2 da proteína cinase C/ domínio de ligação de lípidos dependente de cálcio/ domínio ligação de fosfolípidos; domínio DM14 - específico da família de proteínas CC2D1A cujo papel ainda é desconhecido (NCBI-GENE). Esta proteína está relacionada com os processos de regulação da transcrição. É um repressor do gene do receptor da seratonina. O gene do receptor 5- HT1A é regulado negativamente nas células neuronais através de repressores tais como RES/NRSF, Freud-1, NUDR/Deaf-1 e Hes5 (Ou *et al*, 2003; Albert *et al*, 2004).

A **Myak-S** (*Murine YAK*), também conhecida por Homeodomain interacting protein kinase 1 (Hipk1) é uma proteína da família das cinases Ser/Thr e da subfamília das Hipk1. Ela fosforila factores de transcrição com homeodomínio e pode também funcionar como co-repressor desses mesmos factores de transcrição (Li *et al*, 2005).

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 MATERIAIS

II.1.1 SISTEMAS BIOLÓGICOS USADOS

Para a expressão de proteínas foi usada a estirpe de *Escherichia coli* DH5α (*F*, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*rK*⁻, *mK*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

II.1.2 CLONAGENS EM DIFERENTES VECTORES DE EXPRESSÃO EM *E. COLI*.

Os fragmentos F1 (correspondente ao domínio CYS da Prickle) (Fig. 4) e F2 (correspondente ao domínio PET da Prickle) (Fig. 4) foram previamente clonados nos locais de restrição *EcoRI* e *XhoI* no vector **pGEX 4T-1** (GE Healthcare Amersham). A clonagem dos fragmentos de DNA neste vector de expressão dá origem a proteínas de fusão com o enzima Glutathione S-transferase (GST) e neste caso a expressão do vector com os fragmentos da Prickle dá origem às proteínas GST-F1 (aproximadamente 31 kDa) e GST-F2 (aproximadamente 38,5kDa), respectivamente. Este plasmídeo possui um repressor *lac Iq*, podendo a sua expressão ser induzida por um indutor (IPTG) em estirpes de *E. coli*. Como marca de selecção contém um gene que confere resistência à Ampicilina.

As proteínas incompletas Rock1 (GeneID: 19877), Pias3 (GeneID: 229615) e Myak-S (GeneID: 100046825) foram previamente clonadas no local de restrição *SalI* no vector **pQE-31** (Qiagen); e a proteína incompleta Freud-1 (GeneID: 212139) foi previamente clonada nos locais de restrição *BamHI* e *SalI* no vector **pQE-32** (Qiagen). A clonagem dos fragmentos de DNA nestes vectores de expressão dá origem a proteínas de fusão com uma cauda de 6 Histidinas (6xHis) e neste caso a expressão do vector com as proteínas incompletas Rock1,

Pias3, Freud-1 e Myak-S dá origem às proteínas His₆-Rock (aproximadamente 37 kDa), His₆-Pias (aproximadamente 46 kDa), His₆-Freud (aproximadamente 60 kDa) e His₆-Myak (aproximadamente 20 kDa), respectivamente. Este vector também contém um gene que confere resistência à Ampicilina e a expressão das proteínas de fusão também pode ser induzida pela presença de IPTG.

II.1.3 ANTICORPOS

Foram usados os seguintes anticorpos:

Anticorpos primários:

- anti-His₆-HRP, 11965085001 da ROCHE, clone BMG-His₁, monoclonal de ratinho,
- anti-GST-HRP, RPN1236 da GE Healthcare, policlonal de cabra
- anti-Prickle1, R3782 da Sigma Aldrich, policlonal de coelho
- anti-Rock1, 611136 da BD Transduction Laboratories, clone 46/ROCK1, monoclonal de ratinho
- anti-Pias3, sc-48339 da Santa Cruz Biotechnology, clone E-3, monoclonal de ratinho

Anticorpos secundários:

- anti-mouse IgG HRP, A2304 da Sigma-Aldrich, policlonal de cabra
- anti-rabbit IgG HRP, NA934 da GE Healthcare, policlonal de burro

II.1.4 MEIO LURIA BROTH (LB)

O meio LB foi preparado contendo Triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v). Para ser usado como meio selectivo para as bactérias transformadas, foi adicionada Ampicilina como marca de selecção, à concentração final de 10mg/ml, designado por meio LBAp. Para se obter meio LB sólido, adicionou-se 1% (p/v) de agar.

II.2 MÉTODOS

II.2.1 INDUÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

Escherichia coli DH5 α já transformadas com plasmídeos (pGEX-4T-1 para os fragmentos F1 e F2; pQE-31 para Rock1, Pias3 e Myak-S e pQE-32 para Freud-1) e armazenadas em glicerol 20%, a -80°C foram recolhidas com uma ansa e foram realizadas quatro repicagens alternando entre meio LBAp líquido e meio LBAp sólido. O crescimento realizou-se a 37°C durante 16h, para cada passagem, para activar as células. Após as repicagens, prepararam-se as culturas de meio LBAp líquido, preparadas com as pré-culturas de células de *E. coli*, numa proporção de 1:10. Colocaram-se as culturas em agitação a 30°C até que o crescimento bacteriano esteja em plena fase exponencial (A_{580nm} = 0,6). Nessa altura, retira-se uma alíquota de 1ml (tempo 0) para posterior análise em SDS-PAGE seguida de análise por *Western Blot*, sendo considerada o controlo sem indução. A alíquota é centrifugada a 5000rpm durante 4 minutos a 25°C, despreza-se o sobrenadante e guarda-se o sedimento de células a -20°C. Às culturas em crescimento, adicionou-se 1mM de *Isopropil- β -D-tiogalactoside* (IPTG), que irá funcionar como indutor do gene que codifica a proteína de interesse. A temperatura é reduzida de 30°C para 25°C, de modo a limitar a degradação do indutor durante a indução. A cada hora é retirada uma alíquota (tempo 1, 2, 3 e 4) e procede-se como referido acima. Ao fim de 4 horas, retirámos a última alíquota. As culturas são submetidas a uma centrifugação nas mesmas condições descritas para as alíquotas (5000rpm durante 5 minutos a 25°C). O sobrenadante é desprezado e o sedimento de células é armazenado em tubos Falcon de 5ml a -20°C.

II.2.2 LISE CELULAR

Adicionou-se tampão de lise TENG N^{+} (50mM de Tris HCl pH 7,4; 1mM de EDTA; 100mM de NaCl; 10% (v/v) de glicerol; 1% (v/v) de IGEPAL; 1mM (v/v) de DTT) e lisozima à concentração final de 0,5mg/ml ao sedimento de células final da indução na proporção de 1:10. O sedimento de células usado é o equivalente a 9ml de cultura, sendo posteriormente adicionado 900 μ l de tampão TENG N^{+} . Colocaram-se os extractos em gelo com agitação

durante uma hora, sendo depois colocados a 95°C durante um minuto, seguido de um minuto de *vortex*. O choque térmico e a acção mecânica potenciam a lise celular. Repetiram-se estes três passos mais duas vezes.

II.2.3 GST PULL-DOWN

As proteínas (GST, GST-F1, GST-F2, His₆-Rock, His₆-Pias, His₆-Freud e His₆-Myak) foram sobreexpressas em *E. coli* DH5α nas condições anteriormente descritas. Foi usado o *kit* MicroSpin GST Purification Module (27-4570-03 da GE Healthcare), tendo sido usado o protocolo descrito na bula do produto, com algumas modificações. O tempo de incubação das amostras com a matriz das colunas foi de 1h 15min. Realizaram-se três lavagens com o tampão de lavagem. Antes da eluição final, para detectar a interacção entre as proteínas, foi adicionada uma segunda amostra. Após a incubação dessa segunda amostra na coluna durante 1h 15min, foram realizadas mais três lavagens com o tampão de lavagem e finalmente foi adicionado o tampão de eluição, que esteve em contacto com a matriz durante 30min antes da centrifugação final. Era utilizado o volume total do extracto de bactérias lisado, ou seja, 900μl. Todo o volume resultante das passagens na coluna foi recolhido e preparado para aplicação em gel e posterior análise por *Western Blot*. Para isso, foram aplicados 20μl de cada amostra, com 5μl de Tampão de Amostra, no gel.

II.2.4 PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE RATINHO

Embriões de ratinhos com 10,5 e 18,5 dias de gestação, provenientes de cruzamentos entre animais da estirpe CD-1 foram homogenizados em Tampão de Lise refrigerado (150 mM NaCl : 1 % (v/v) de Triton : 50 mM de HEPES pH7.5 : 2 mM de EDTA : 10 % (v/v) de glycerol : 50 mM de NaF : 1mM de Na₃VO₄ e inibidores de proteases Complete, Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (1697498, Boehringer Mannheim)). Após 15 minutos a agitar a 25°C, seguidos de 1h a agitar a 4°C, os homogenatos foram centrifugados a 15.000 g durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e quantificado com Bio-Rad Protein Assay, seguindo as instruções da bula.

II.2.5 ELECTROFORESE EM SDS-PAGE

A técnica de electroforese em SDS-PAGE foi usada para analisar os extractos proteicos e verificar se houve indução e interacção das proteínas de interesse. Foram preparados géis de poliacrilamida a 12% (p/v). A cada sedimento de células contendo as proteínas totais das células de *E. coli*, foi adicionado 50 µl de água destilada e 50 µl de Tampão de Amostra (5% de β-mercaptoetanol e 95% de Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)). As alíquotas foram submetidas a 95°C durante 5 minutos para desnaturar as proteínas. Aplicou-se 20µl de cada alíquota no gel. Foram usados 5µl de marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad). A electroforese no gel de condensação foi realizada a 25mA e no gel de resolução foi realizada a 35mA. Após a electroforese terminar, os géis foram corados com Azul de Coomassie (161-0436, Bio-Rad) durante 16h a 25°C.

II.2.6 WESTERN BLOT

Após a realização de electroforese em SDS-PAGE, procedeu-se ao ensaio de *Western Blot* para detectar e identificar as proteínas de interesse, através do uso de anticorpos específicos. Foi montado o sistema de Western Blot com membrana de nitrocelulose (Amersham™ Hybond™ ECL da GE Healthcare) e utilizado o Tampão de Transferência (Tris-HCl 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20% (v/v), pH 8,3 (Bio-Rad)). A transferência foi realizada a 150mA durante 75 minutos. Terminada a transferência, a membrana é corada com Solução de Coloração (Ponceau S 0,2% (p/v); ácido acético 1%) durante 16h a 25°C para certificar que a transferência se realizou com sucesso. Caso tal seja observado, a membrana é devidamente lavada com água destilada, de modo a retirar o excesso de corante, e é bloqueada com 5% (p/v) de agente bloqueador em PBS 0,01M (NaCl 140mM; KCl 3mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM e ajustar 7,4 pH) –de Tween 20 0,1% (v/v) durante 1 hora. Finda essa hora, é adicionado o anticorpo primário (anti-GST numa proporção de 1/5000; anti-His6 numa proporção de 1/1000; anti-Prickle1 com várias diluições, incluindo 1/1000, 1/500 e 1/250; anti-Rock1 numa proporção de 1/500 e anti-Pias3 numa proporção de 1/50) a agente bloqueador 5% (p/v) em PBS 0,01M – Tween 20 0,1% (v/v) e deixa-se a incubar com a membrana durante uma hora. Após esse passo, lava-se a membrana com PBS 0,01M – Tween 20 0,1% (v/v) quatro vezes durante 15 minutos de cada vez. Quando necessário, foi

adicionado o anticorpo secundário (anti-mouse IgG numa proporção de 1/250 e anti-rabbit IgG numa proporção de 1/5000) nas mesmas condições acima descritas, seguido de mais lavagens. Utilizou-se o kit Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) para se proceder à exposição em chapas Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III. RESULTADOS

A estratégia seguida para a validação bioquímica *in vitro* da interacção das proteínas previamente detectadas pela técnica do duplo híbrido com os fragmentos da proteína Prickle inclui a expressão das proteínas em bactérias *Escherichia coli* DH5 α . Os resultados foram confirmados por *Western Blot* e posteriormente foram realizados os ensaios de GST pull-down. Foram também realizados testes prévios à realização dos ensaios de co-imunoprecipitação, nomeadamente de especificidade dos anticorpos anti-Prickle, anti-Rock1 e anti-Pias3.

III.1 INDUÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

Antes da realização de ensaios de GST pull-down para a detecção de interacções entre o fragmento F2 da proteína Prickle e as proteínas Rock1, Pias3, Freud-1 e Myak-S é necessário obter grandes quantidades dessas proteínas ou, no nosso caso, das proteínas de fusão: GST-F1 – 31kDa; GST-F2 – 38,5kDa; His₆-Rock – 37kDa; His₆-Pias – 46kDa e His₆-Freud – 60kDa.

A adição de um indutor às culturas de bactérias permite que estas expressem as construções presentes nos vectores, com as quais foram transformadas.

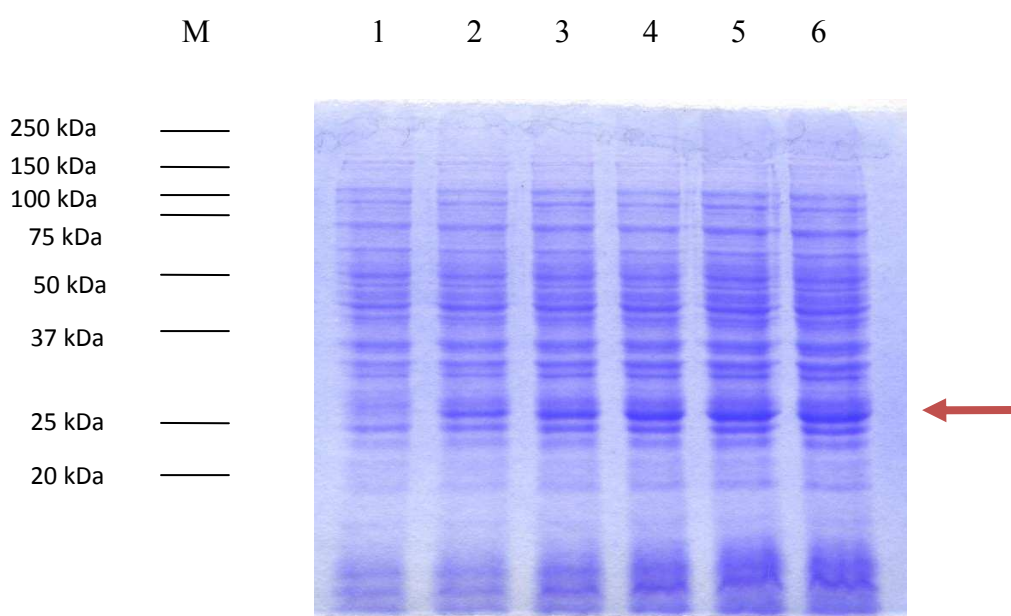
O IPTG foi o indutor utilizado para induzir a transcrição dos genes clonados nos vectores de expressão pGEX e pQE, ao se ligar e inibir o repressor LacI. A adição deste composto a uma cultura em fase exponencial de crescimento permite a expressão da proteína cujo DNA codificante foi inserido no vector com o *tag* correspondente: GST no caso dos fragmentos da Prickle, F1 e F2; e uma cauda de 6 Histidinas no caso das proteínas Rock1, Pias3, Freud-1 e Myak-S.

A indução do enzima GST também foi realizada, uma vez que esta proteína irá servir de controlo negativo na técnica de GST pull-down, de modo a verificar se as proteínas de

interesse apresentam qualquer interação com esta proteína que está em fusão com os fragmentos F1 e F2 de Prickle, o que inviabilizaria a utilização desta técnica para testes *in vitro*.

Durante a indução recolheram-se amostras de hora a hora, sendo depois visualizadas através da técnica SDS-PAGE e *Western Blot*. Estas técnicas foram usadas em conjunto para nos certificarmos que as bandas que aumentavam de intensidade correspondiam às proteínas reconhecidas pelos anticorpos específicos os *tags* das fusões: anti-GST e anti-His₆.

A)



B)



Figura 6 – Análise electroforética da indução de GST em *E. coli* DH5a por (A) SDS-PAGE a 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 3h30 de indução; 6 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente ao GST (≈27 kDa).

Na figura 6 A observamos que uma banda com cerca de 27kDa, massa molecular correspondente à proteína GST, aparece em pequena quantidade nas células às quais não se adicionou IPTG (pista 1), enquanto que nas células em que se adicionou IPTG essa banda aparece mais forte (pistas 2-6) e aumenta de intensidade. A confirmação de que essa banda corresponde à proteína GST foi obtida pelo ensaio de *Western Blot*, em que o anticorpo anti-GST reconhece a banda de 27kDa (Fig. 6 B).

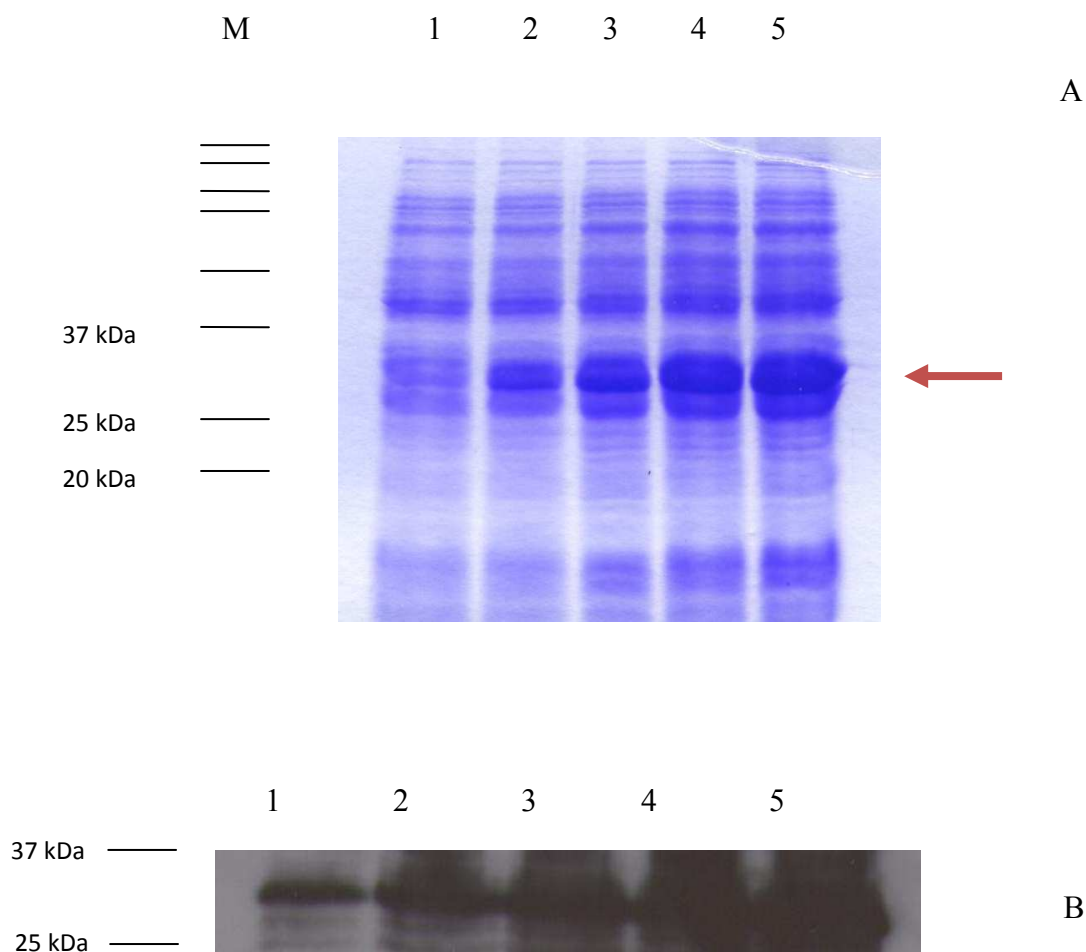


Figura 7 – Análise electroforética da indução de GST-F1 em *E. coli* DH5α por (A) SDS-PAGE a 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente ao GST-F1 (≈31 kDa).

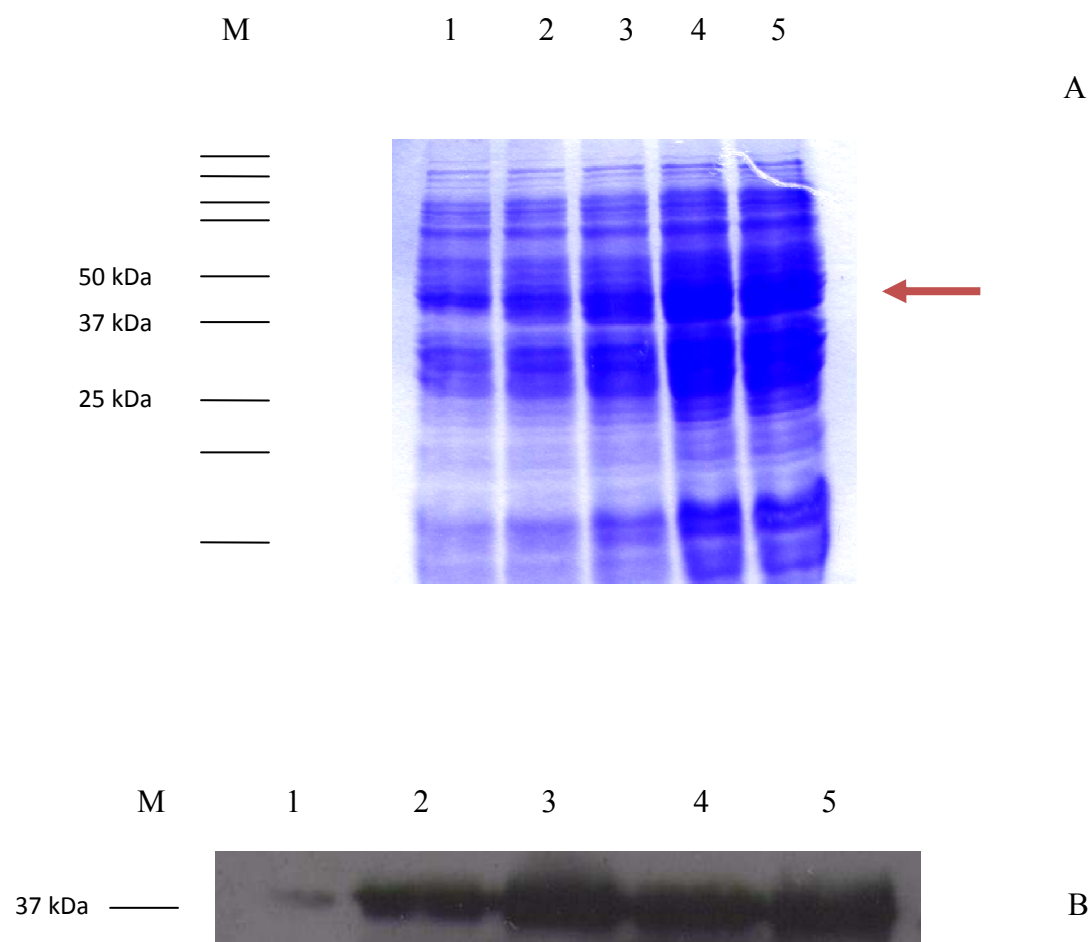


Figura 8 – Análise electroforética da indução de GST-F2 em *E. coli* DH5α por (A) SDS-PAGE a 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente ao GST-F2 (≈38,5 kDa).

O mesmo tipo de resultados foram obtidos na indução de células com GST-F1 (Fig. 7) e GST-F2 (Fig. 8)

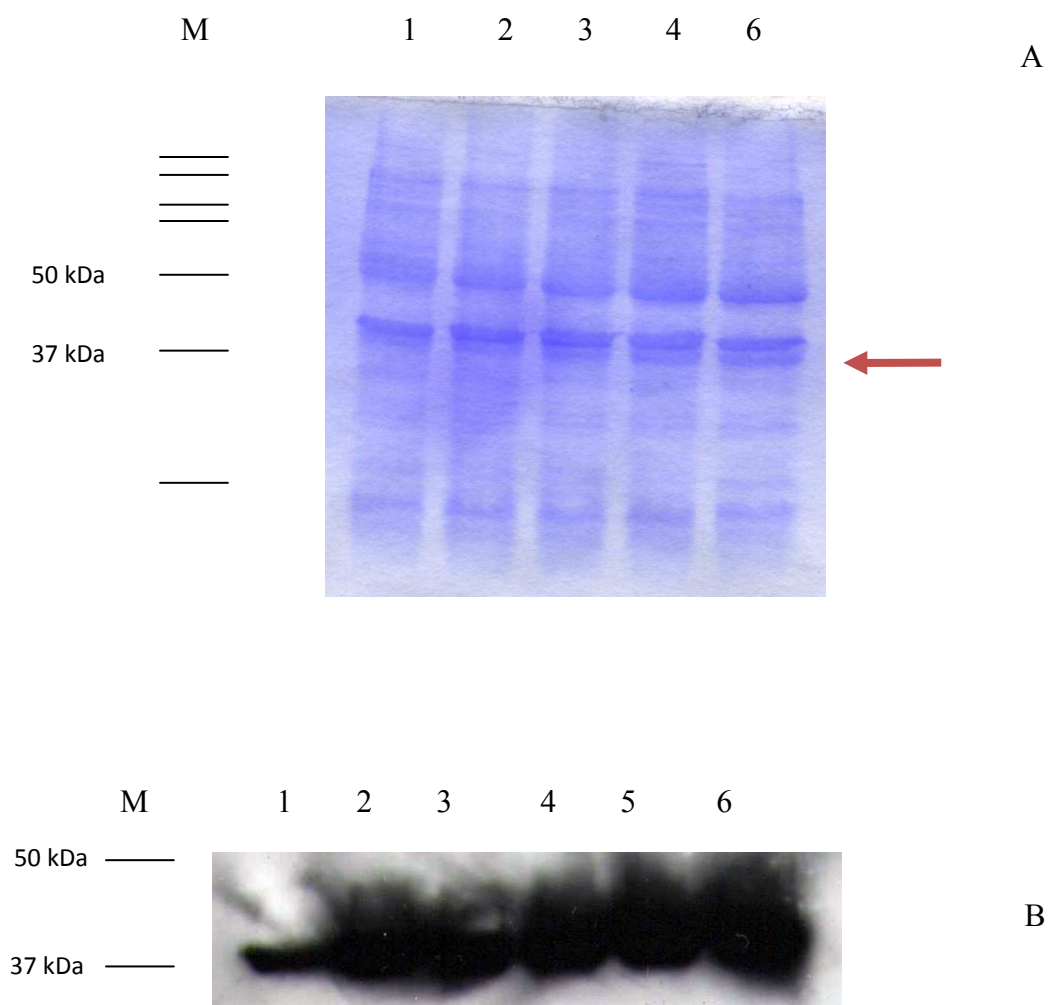


Figura 9 – Análise electroforética da indução de His₆-Rock em *E. coli* DH5α por (A) SDS-PAGE 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 3h30 de indução; 6 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente a His₆-Rock (≈37 kDa).

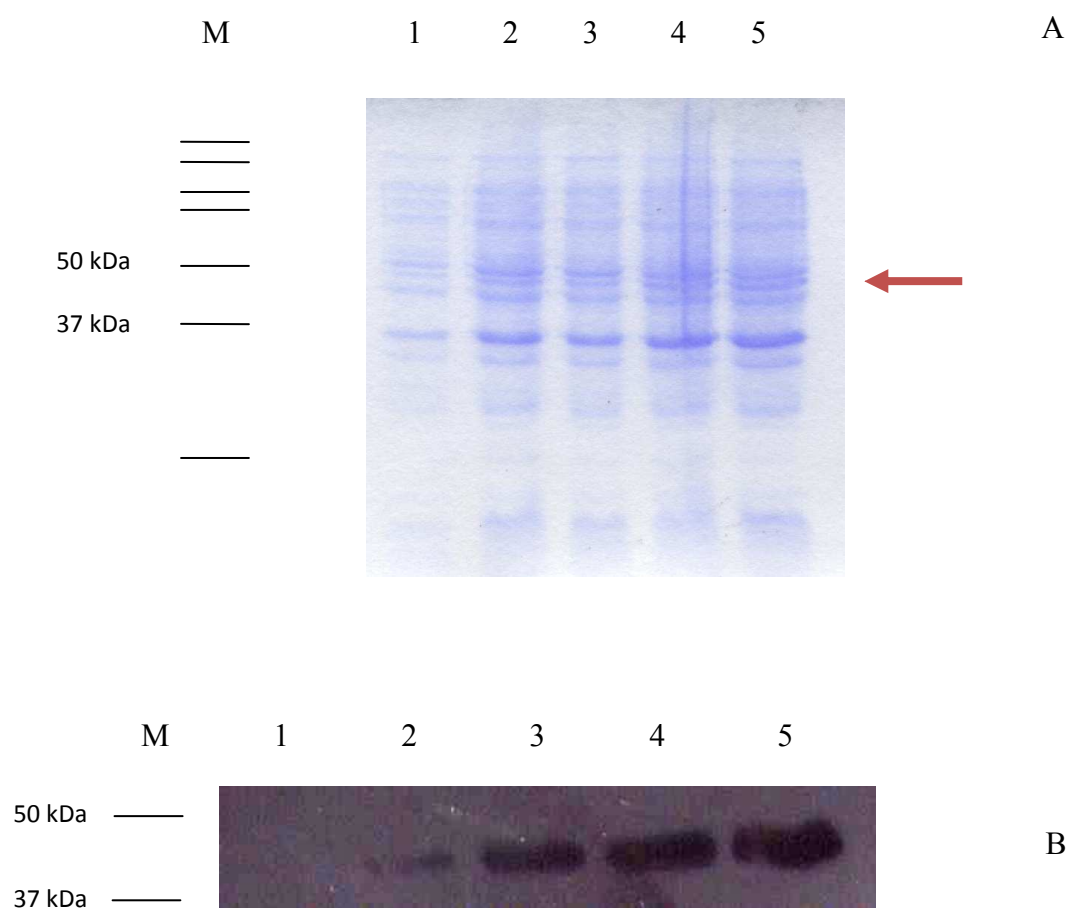


Figura 10 - Análise electroforética da indução de His₆-Pias em *E. coli* DH5a por (A) SDS-PAGE a 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente a His₆-Pias (≈46 kDa).

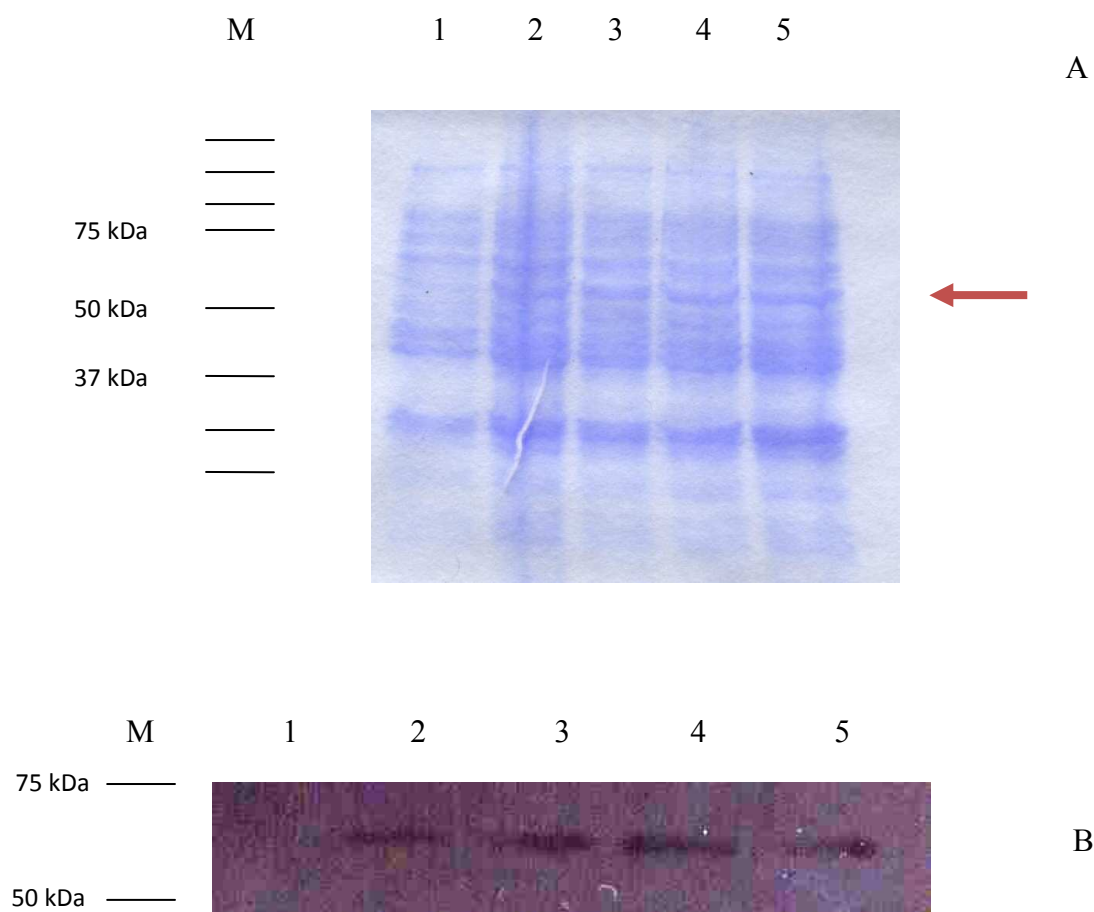


Figura 11 – Análise electroforética da indução de His₆-Freud em *E. coli* DH5α por (A) SDS-PAGE a 12% e (B) *Western Blot* com anticorpo anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Tempo 0 (sem indução); 2 – 1h de indução; 3 – 2h de indução; 4 – 3h de indução; 5 – 4h de indução. (←) indica banda correspondente a His₆-Freud (≈60 kDa).

Nos casos de His₆-Rock, His₆-Pias e His₆-Freud, foi essencial a análise em *Western Blot* para confirmar se, de facto, teria ou não ocorrido indução uma vez que as bandas coradas por Coomassie não apresentam grandes diferenças sem e com indução por IPTG (Figs. 9, 10 e 11, respectivamente). A quantidade de His₆-Freud obtida após a indução foi reduzida mas o trabalho com esta proteína prosseguiu, uma vez que a proteína foi detectada por *Western Blot*, que é uma técnica mais sensível e específica do que a coloração com Azul de Coomassie. Finalmente, não foi possível obter ou detectar a expressão de His₆-Myak (resultados não mostrados). O *Western Blot* com anticorpo anti-His₆ não indicou a presença de qualquer proteína de fusão, mesmo após várias modificações nas condições de indução, nomeadamente: na concentração de indutor, tempo de indução e temperatura. Decidiu-se abandonar os ensaios com esta construção.

Após a obtenção de extractos proteicos com quantidades suficientes das proteínas GST, GST-F1, GST-F2, His₆-Rock, His₆-Pias e His₆-Freud, estávamos em condições de realizar os ensaios de GST pull-down.

III.2 ENSAIOS PARA CONTROLO DA COLUNA DE AFINIDADE

O ensaio de GST pull-down baseia-se nos mesmos princípios de uma cromatografia de afinidade, apresentando-se como um método bioquímico *in vitro*, de detecção ou verificação de interacções entre proteínas.

O glutathione é o substrato do GST. Quando o GST em fusão com a proteína entra em contacto com o glutathione que está presente na matriz da coluna de cromatografia, forma uma ligação. Após a lavagem da coluna para remover proteínas sem GST, que se ligaram inespecificamente é então adicionada a segunda proteína ou extracto proteico. Caso haja interacção entre estas duas proteínas, permanecerão as duas na coluna, mesmo após lavagens. Finalmente, é adicionado glutathione reduzido à coluna, o que quebrará a ligação do GST com o substrato, sendo então eluído da coluna o complexo proteico.

Antes dos ensaios de GST pull-down fizemos ensaios prévios para confirmarmos que a proteína GST ou as proteínas em fusão com GST ficavam ligadas especificamente à coluna (Figs. 12, 13 e 14). Assim realizámos todos os passos do ensaio de GST pull-down excepto a

adição do 2º extracto proteico, recolhemos as fracções correspondentes ao *flow through* (pista 2), lavagens (pistas 3 e 4) e eluição final (pista 5). Os resultados apresentados correspondem a *Western Blots* das várias fracções, usando anticorpos específicos para GST.

As amostras resultantes de todos os passos do ensaio (*flow through* do extracto proteico à coluna, as várias lavagens e a eluição final) foram analisadas em SDS-PAGE com posterior coloração em Azul de Coomassie ou realizando um *Western Blot* (Schechtman *et al*, 2003).

Devido ao facto de todas as proteínas-isco (GST, GST-F1 e GST-F2) terem sido expressas em fusão com GST e as proteínas-alvo terem sido expressas em fusão com His₆ (His₆-Rock, His₆-Pias e His₆-Freud), os resultados apresentados por *Western Blot*, utilizam anticorpos anti-GST e anti-His₆ para as proteínas de fusão, respectivamente.



Figura 12 – Análise da purificação de GST em colunas MicroSpin GST Purification Module (GE Healthcare) com *Western Blot* usando o anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução 4h de GST; 2 – *Flow through* da amostra de GST; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – Eluição final

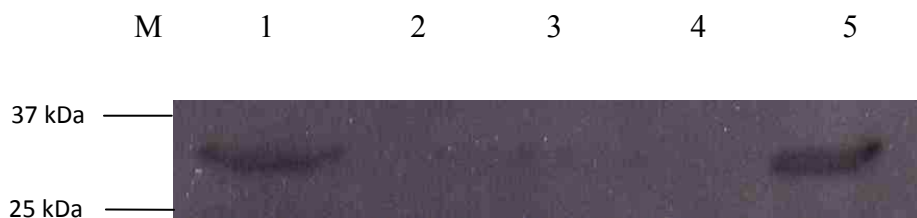


Figura 13 – Análise da purificação de GST-F1 em colunas MicroSpin GST Purification Module (GE Healthcare) com *Western Blot* usando o anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Indução 4h de GST-F1; 2 – *Flow through* da amostra de GST-F1; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – Eluição final

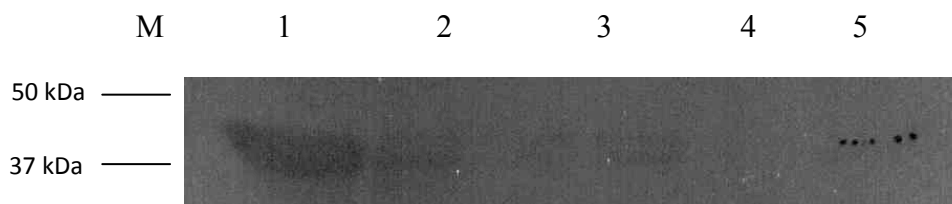


Figura 14 – Análise da purificação de GST-F2 em colunas MicroSpin GST Purification Module (GE Healthcare) com *Western Blot* usando o anticorpo anti-GST.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Indução 4h de GST-F2; 2 – *Flow through* da amostra de GST-F2; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – Eluição final

Tanto GST (Fig. 12) como GST-F1 (Fig. 13) apresentavam perfis em *Western Blot* idênticos e a concentração final de proteína recuperada na eluição final (pista 5) é elevada, o que indica que a retenção pela coluna está a funcionar bem. A concentração final de GST-F2 (Fig. 14) na eluição final é muito mais baixa (pista 5). De modo a melhorar o rendimento final, decidiu-se aumentar os tempos de incubação dos lisados celulares na coluna (dos originais 15 minutos por amostra, descritos na bula para 1 hora e 45 minutos) e realizar mais uma lavagem por amostra (para um total de três por ensaio), numa tentativa de evitar contaminações com proteínas que não as de interesse.

III.3.1 ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE ROCK E PRICKLE

Inicialmente foram realizados ensaios em que as proteínas-alvo foram adicionadas à coluna, sem a adição prévia de proteína-isco. Estes ensaios permitem verificar se essas proteínas se ligam inespecificamente à matriz da coluna, outro facto que poderá interferir com os resultados finais (Fig. 15).

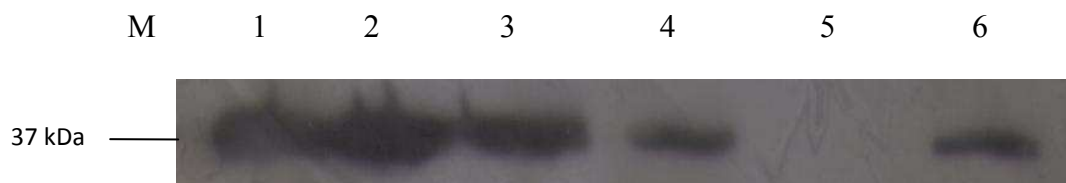


Figura 15 –Ensaio de ligação de His₆-Rock à coluna de afinidade usando o anticorpo anti-His6 para *Western Blot*.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução 4h de His₆-Rock; 2 – *Flow through* da amostra de His₆-Rock; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – 3ª lavagem; 6 - Eluição final

No ensaio de ligação da fusão His₆-Rock à matriz da coluna, verificámos que esta proteína está presente na eluição final, mesmo após as lavagens (Fig. 15). Isto poderá ser devido a factores físicos ou a uma qualquer interacção inespecífica entre a construção e o glutathione presente na coluna.

Utilizámos GST sem o fragmento Prickle como controlo negativo, pois era importante verificar se as proteínas-alvo, identificadas pelo sistema de duplo híbrido, iriam interagir com o GST. Caso isso acontecesse, a metodologia teria de ser revista, visto tal interacção interferir com os restantes resultados. Só se isso não se verificasse se prosseguiria então para o uso das construções com os fragmentos de Prickle, como proteínas-isco.

Tendo em conta a técnica, espera-se observar proteínas-isco no passo de adição à coluna e possivelmente em posteriores lavagens, se a quantidade de proteína adicionada for muito elevada, e na eluição final, quando a adição de glutathione reduzido quebra a ligação do enzima GST ao glutathione que reveste a matriz da coluna. Caso não seja observada nestes casos, terá de se proceder a um aumento de extracto proteico inicial adicionado à coluna, ou a alterações nas condições de ligação da proteína-isco à coluna ou da eluição desta da coluna.

A presença ou ausência de uma proteína-alvo na eluição final, utilizando anticorpo anti-His₆, é indicativa de ter ou não havido interacção entre esta e a proteína-isco, respectivamente. Poder-se-á também observar a sua presença no passo de adição à coluna e posteriores lavagens, caso a quantidade de proteína-alvo seja muito elevada em relação às interacções estabelecidas com a proteína-isco.

Em todos os casos foi utilizado o anticorpo anti-GST, que reconhece a proteína-isco adicionada inicialmente à coluna. Este passo permite garantir que, de facto, a proteína-isco estava presente na coluna. Caso contrário, não seria possível averiguar a interacção entre os fragmentos de Prickle e as demais proteínas. Em todos os casos as proteínas-isco ligaram-se à matriz da coluna, sendo essa ligação quebrada apenas na eluição final (painel B de Fig 16 e painel A de Figs. 17, 18, 20-22, 24-26).

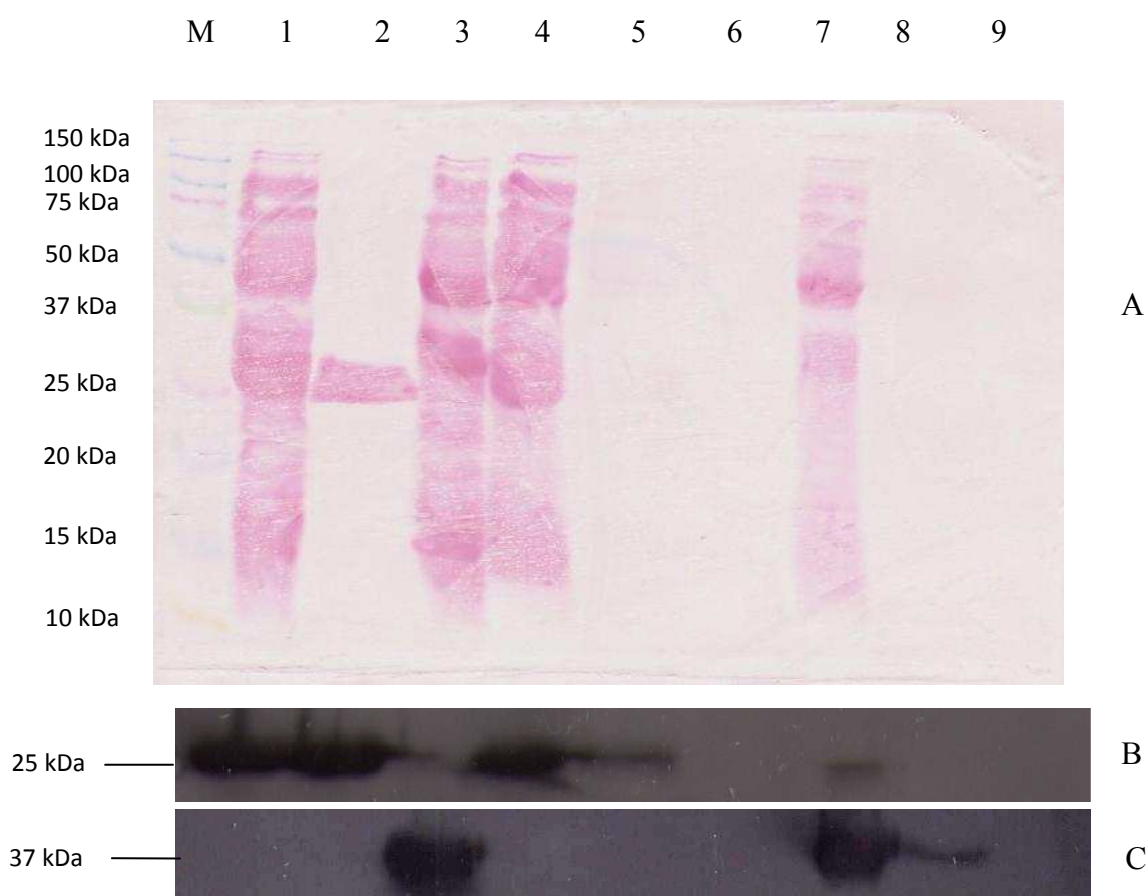


Figura 16 – Ensaio de GST pull-down de GST+His₆-Rock (A) Membrana corada com Ponceau S; *Western Blot* usando os anticorpos (B) anti-GST e (C) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (BioRad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução 4h de His₆-Rock; 4 – *Flow through* da amostra de GST; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Rock; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na figura 16 A apresentamos os resultados da coloração da membrana com Ponceau S, onde se pode observar a distribuição das proteínas colocadas nos vários pistas. Estes resultados permitem-nos afirmar que as proteínas foram eficientemente transferidas para a membrana.

Na Fig. 16 B e C encontram-se os resultados do *Western Blot* utilizando os anticorpos anti-GST e anti-His₆, respectivamente.

Nos pistas 1 e 3 observamos claramente as proteínas induzidas, GST e His₆-Rock presentes nos extractos, garantindo assim a eficácia do processo de *Western Blot* e dos respectivos anticorpos.

O extracto proteico com GST induzido foi depositado na coluna, e na fracção *flow through* (pista 4) verificamos que nem toda a proteína GST ficou ligada, garantindo assim que estamos a saturar a coluna. Nas fracções correspondentes às lavagens do GST (pistas 5B e 6B) ainda se observa libertação de GST em excesso. Após adição do 2º extracto contendo His₆-Rock, verificamos que nem toda a proteína induzida ficou ligada (pista 7C) e o excesso é eliminado nas lavagens (pistas 8C e 9C). Na eluição final (pistas 2B e 2C) verificamos que só está presente a proteína GST (pista 2B).

Estes resultados mostram que His₆-Rock não se liga a GST, como seria de esperar. Por outro lado mostram que a presença de GST na coluna de afinidade evita a ligação inespecífica de His₆-Rock à coluna, observada na Fig. 15.

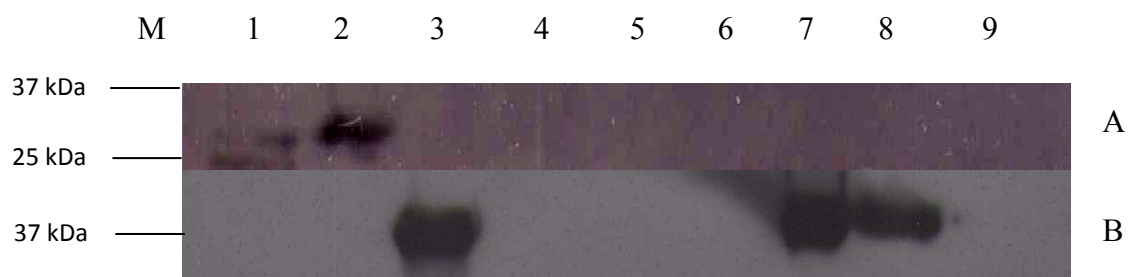


Figura 17 – Ensaio de GST pull-down de GST-F1+His₆-Rock com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F1; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução 4h de His₆-Rock; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F1; 5 – 1^a lavagem; 6 – 3^a lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Rock; 8 – 4^a lavagem; 9 – 6^a lavagem

Na Fig. 17 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F1 e His₆-Rock.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) a presença de GST-F1, embora esta proteína não seja detectada no *flow through* nem nas lavagens (pistas 4A, 5A e 6A). É confirmada a presença de His₆-Rock no *flow through* e nas lavagens (pistas 7B, 8B e 9B). A ausência de His₆-Rock na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína não se liga ao fragmento F1 de Prickle. Este resultado está de acordo com os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho, uma vez que esta proteína mostrou ligar-se apenas ao fragmento F2 de Prickle.

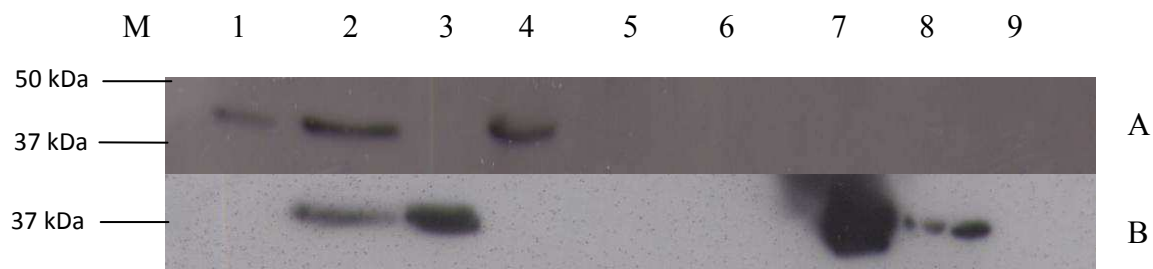


Figura 18 – Ensaio de GST pull-down de GST-F2+His₆-Rock com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F2; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução 4h de His₆-Rock; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F2; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Rock; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 18 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F2 e His₆-Rock.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) e no *flow through* (pista 4A) a presença de GST-F2. A presença de His₆-Rock é confirmada no *flow through* e nas lavagens (pistas 7B, 8B e 9B). A presença de His₆-Rock na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína interage com o fragmento F2 de Prickle. Este resultado está de acordo com os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho, uma vez que esta proteína mostrou ligar-se a este fragmento de Prickle.

Já tinham sido descritas interações entre as vias Wnt canónica e não-canónicas e as GTPases RhoA e Rac1 (Shimada *et al*, 2006). A via de sinalização da PCP tem um papel crucial na embriogénese e divisão celular (Fanto e McNeill, 2004), e é também de grande importância na polarização de pêlos, tanto na *Drosophila*, como em vertebrados (Guo *et al*, 2004). Todos estes processos têm por base alguma reestruturação do citoesqueleto de actina, uma função que já fora identificada para Rock (Wei, 2001; Noma *et al*, 2006). Não é de todo surpreendente que haja um ponto de ligação entre a via de sinalização da PCP e esta proteína.

III.3.2 ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE PIAS E PRICKLE

Inicialmente foram realizados ensaios em que as proteínas-alvo foram adicionadas à coluna, sem a adição prévia de proteína-isco. Estes ensaios permitem verificar se essas proteínas se ligam inespecificamente à matriz da coluna, outro facto que poderá interferir com os resultados finais (Fig. 19).

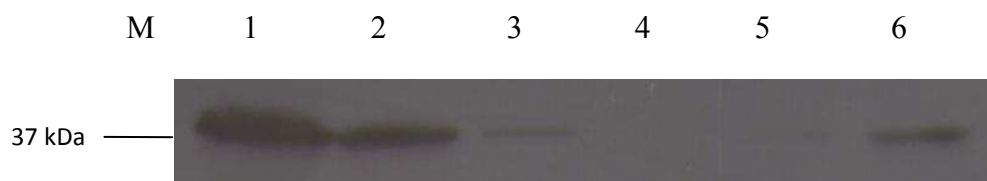


Figura 19 –Ensaio de ligação de His₆-Pias à coluna de afinidade usando o anticorpo anti-His₆ para o *Western Blot*.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias; 2 – *Flow through* da amostra de His₆-Pias; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – 3ª lavagem; 6 - Eluição final

A fusão His₆-Pias ligou-se à matriz da coluna (Fig. 19), à semelhança com o que aconteceu com His₆-Rock. Mais uma vez torna-se importante a realização de um ensaio no qual o GST é primeiramente adicionado à coluna, antes da aplicação de His₆-Pias. Esse ensaio permitirá, como aconteceu com Rock-His₆, observar se Pias interage com GST e, igualmente importante, se, estando a matriz da coluna revestida com GST, His₆-Pias continua a ser retida até à eluição final.

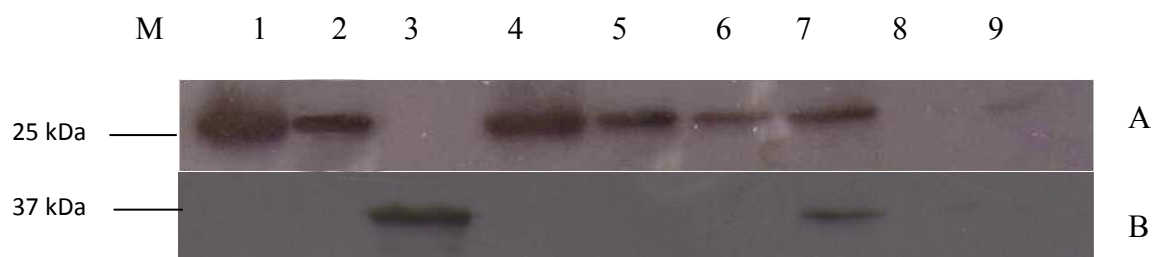


Figura 20 – Ensaio de GST pull-down de GST+His₆-Pias com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias; 4 – *Flow through* da amostra de GST; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Pias; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 20 A e B encontram-se os resultados do *Western Blot* utilizando os anticorpos anti-GST e anti-His₆, respectivamente.

Nas pistas 1 e 3 observamos claramente as proteínas induzidas, GST e His₆-Pias presentes nos extractos, garantindo assim a eficácia do processo de *Western Blot* e dos respectivos anticorpos.

O extracto proteico com GST induzido foi depositado na coluna, e na fracção *flow through* (pista 4) verificamos que nem toda a proteína GST ficou ligada, garantindo assim que estamos a saturar a coluna. Nas fracções correspondentes às lavagens do GST (pistas 5A e 6A) ainda se observa libertação de GST em excesso. Após adição do 2º extracto contendo His₆-Pias, verificamos que nem toda a proteína induzida ficou ligada (pista 7B) embora não seja visível a eliminação do excesso nas lavagens (pistas 8B e 9B). Na eluição final (pistas 2A e 2B) verificamos que só está presente a proteína GST (pista 2A).

Estes resultados mostram que His₆-Pias não se liga a GST, como seria de esperar. Por outro lado mostram que a presença de GST na coluna de afinidade evita a ligação inespecífica de His₆-Pias à coluna, observada na Fig. 19.

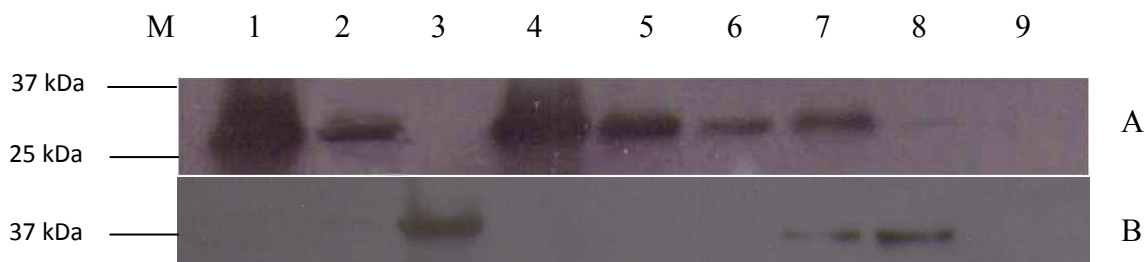


Figura 21 – Ensaio de GST pull-down de GST-F1+His₆-Pias com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F1; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F1; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Pias; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 21 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F1 e His₆-Pias.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) a presença de GST-F1, sendo esta proteína também detectada no *flow through* e nas lavagens (pistas 4A, 5A e 6A). É confirmada a presença de His₆-Pias no *flow through* e nas lavagens (pistas 7B, 8B e 9B). A ausência de His₆-Pias na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína não se liga ao fragmento F1 de Prickle. Este resultado está de acordo com os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho, uma vez que esta proteína mostrou ligar-se apenas ao fragmento F2 de Prickle.



Figura 22 – Ensaio de GST pull-down de GST-F2+His₆-Pias com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F2; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F2; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Pias; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 22 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F2 e His₆-Pias.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) e no *flow through* (pista 4A), assim como nas lavagens (pistas 5A e 6A), a presença de GST-F2. A presença de His₆-Pias é confirmada no *flow through* e nas lavagens (pistas 7B, 8B e 9B). A presença de His₆-Pias na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína interage com o fragmento F2 de Prickle. Este resultado está de acordo com os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho, uma vez que esta proteína mostrou ligar-se a este fragmento de Prickle.

Pias é uma proteína que já foi identificada como sendo interveniente em vários processos celulares, desde a apoptose (Hebenstreit *et al*, 2005), à diferenciação celular, particularmente a nível de fotoreceptores e células neuronais (Onishi *et al*, 2009), até mesmo ao seu possível papel no cancro e doenças neurodegenerativas (Zhao, 2007). Considerando que Pk é uma proteína central para a via de sinalização da PCP, e tendo sido identificados fenómenos de desordem da via em células cancerosas (Katoh e Katoh, 2007), já para não falar do papel crucial que a via desempenha no processo de desenvolvimento embrionário (Wang, 2009); a identificação desta interacção entre Prickle e Pias não só faz sentido de um ponto de

vista teórico, como também é um passo importante no estudo da relação entre a via de sinalização da PCP e vários processos celulares de relevância clínica e terapêutica.

III.3.3 ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE FREUD E PRICKLE

Inicialmente foram realizados ensaios em que as proteínas-alvo foram adicionadas à coluna, sem a adição prévia de proteína-isco. Estes ensaios permitem verificar se essas proteínas se ligam inespecificamente à matriz da coluna, outro facto que poderá interferir com os resultados finais (Fig. 23).

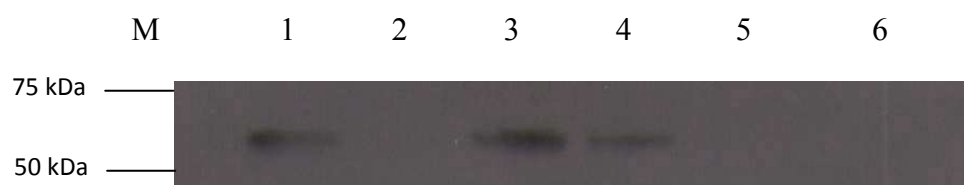


Figura 23 – Ensaio de ligação de His₆-Freud à coluna de afinidade usando o anticorpo anti-His₆ para *Western Blot*.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Freud; 2 – *Flow through* da amostra de His₆-Freud; 3 – 1ª lavagem; 4 – 2ª lavagem; 5 – 3ª lavagem; 6 - Eluição final

Ao contrário do que ocorreu com Rock e Pias, His₆-Freud não aparenta ficar retida na coluna até à eluição final (Fig. 23).

Este facto pode ser devido a uma quantidade inferior de proteína que é adicionada à coluna, ou ao facto de que esta proteína não estabelece interações inespecíficas com a matriz da coluna. De qualquer modo, este resultado é promissor, na medida em que não deverá haver interferências para os restantes resultados.

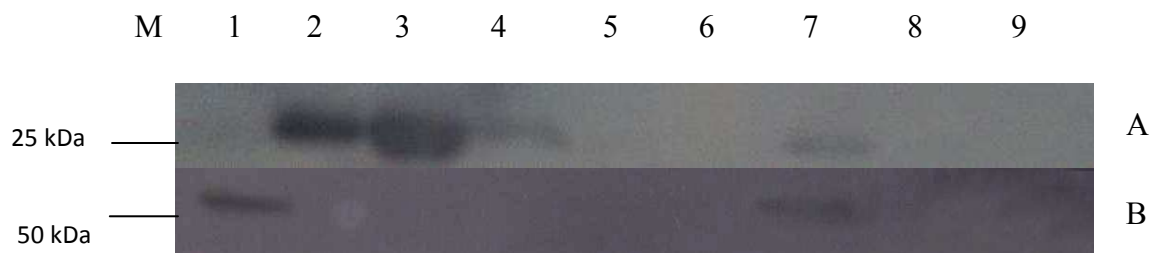


Figura 24 – Ensaio de GST pull-down de GST+His₆-Freud com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Freud; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de GST; 4 – *Flow through* da amostra de GST; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Freud; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 24 A e B encontram-se os resultados do *Western Blot* utilizando os anticorpos anti-GST e anti-His₆, respectivamente.

Nos pistas 1 e 3 observamos claramente as proteínas induzidas, GST e His₆-Freud presentes nos extractos, garantindo assim a eficácia do processo de *Western Blot* e dos respectivos anticorpos.

O extracto proteico com GST induzido foi depositado na coluna, e na fracção *flow through* (pista 4A) verificamos que nem toda a proteína GST ficou ligada, garantindo assim que estamos a saturar a coluna. Nas fracções correspondentes às lavagens do GST (pistas 5A e 6A) não se observa qualquer libertação de GST da coluna. Após adição do 2º extracto contendo His₆-Freud, verificamos que nem toda a proteína induzida ficou ligada (pista 7B) embora não seja visível a eliminação do excesso nas lavagens (pistas 8B e 9B). Na eluição final (pistas 2A e 2B) verificamos que só está presente a proteína GST (pista 2A).

Estes resultados mostram que His₆-Freud não se liga a GST, como seria de esperar.

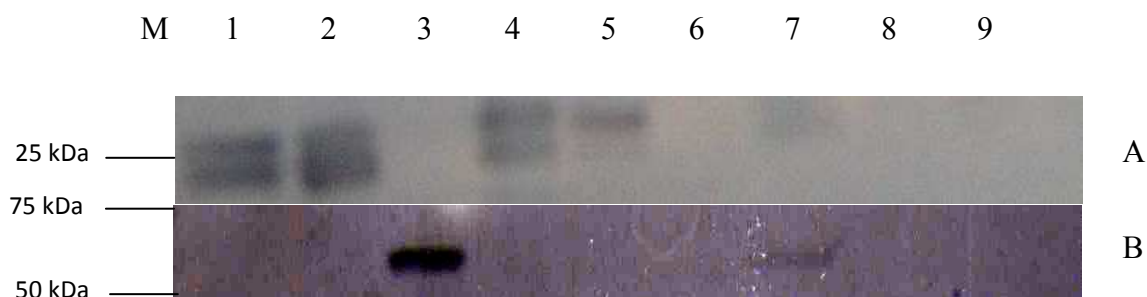


Figura 25 – Ensaio de GST pull-down de GST-F1+His₆-Freud com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F1; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Freud; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F1; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Freud; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 25 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F1 e His₆-Freud.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) a presença de GST-F1, sendo esta proteína também detectada no *flow through* e nas lavagens (pistas 4A, 5A e 6A). É confirmada a presença de His₆-Freud no *flow through* (pistas 7B), embora não seja detectado nas lavagens (pistas 8B e 9B). A ausência de His₆-Freud na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína não se liga ao fragmento F1 de Prickle. Este resultado está de acordo com os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho, uma vez que esta proteína mostrou ligar-se apenas ao fragmento F2 de Prickle.

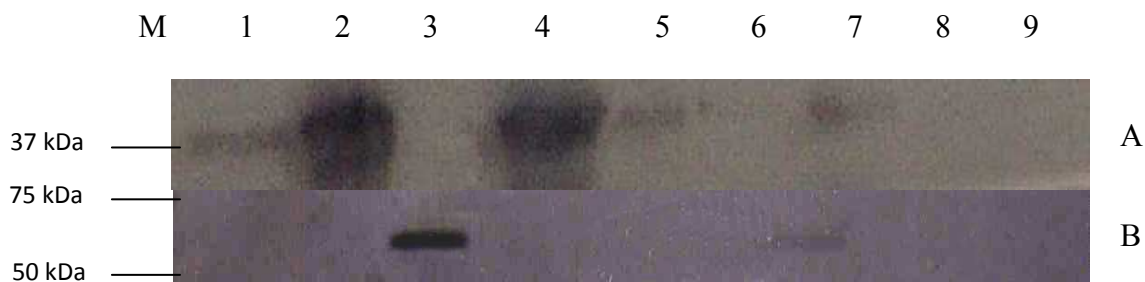


Figura 26 – Ensaio de GST pull-down de GST-F2+His₆-Freud com *Western Blot* usando os anticorpos (A) anti-GST e (B) anti-His₆.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto bruto da indução de 4h de GST-F2; 2 – Eluição final; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Freud; 4 – *Flow through* da amostra de GST-F2; 5 – 1ª lavagem; 6 – 3ª lavagem; 7 – *Flow through* da amostra de His₆-Freud; 8 – 4ª lavagem; 9 – 6ª lavagem

Na Fig. 26 apresentamos os resultados do ensaio de GST pull-down entre GST-F2 e His₆-Freud.

O controlo do *Western Blot* corresponde à banda visível nas pistas 1 e 3, identificadas pelos anticorpos anti-GST e anti-His₆. As quantidades proteicas dos extractos utilizados foram as adequadas uma vez que confirmamos na eluição final (pista 2A) a presença de GST-F2, sendo esta proteína também detectada no *flow through* e nas lavagens (pistas 4A, 5A e 6A). É confirmada a presença de His₆-Freud no *flow through* (pista 7B) mas não nas lavagens (pistas 8B e 9B). A ausência de His₆-Freud na eluição final (pista 2B), mostra que esta proteína não se liga ao fragmento F2 de Prickle. Este resultado contradiz os resultados do rastreio do banco de cDNA de ratinho. Nos ensaios de duplo híbrido, esta proteína mostrou ligar-se ao fragmento F2 de Prickle, algo que não foi observado com este ensaio de GST pull-down.

Embora Freud pertença a uma família de proteínas das quais ainda pouco se sabe, a função que já foi descrita para esta proteína, como repressor do gene do receptor de serotonina (Ou *et al*, 2003; Albert *et al*, 2004), poderia estabelecer mais um ponto de contacto entre a via de sinalização da PCP e o desenvolvimento neuronal.

De qualquer modo, devido a não ter sido observada uma interacção *in vitro* entre esta proteína e Prickle, mesmo tendo em conta o resultado positivo obtido previamente com a técnica de duplo híbrido, implica que o nosso estudo da interacção entre Freud e Prickle foi descontinuado.

III.4 TESTES DE ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS

Um dos métodos mais comuns e credíveis para a demonstração de interacções proteína:proteína é a co-imunoprecipitação de complexos proteicos presentes em extractos celulares contendo as proteínas que interagem. A co-imunoprecipitação (co-IP) confirma interacções usando um extracto celular completo, onde as proteínas estão presentes na sua conformação nativa numa mistura complexa de componentes celulares que podem ser necessários para que se dêem interacções bem sucedidas. Para além disso, o uso de células eucariotas permite modificações pós-traducionais que podem ser necessárias para que uma determinada interacção ocorra, o que se torna impossível de demonstrar em sistemas de expressão procariotas (Promega Corporation, 2007).

Numa experiência típica, as células são lisadas e o extracto celular é preparado em condições não desnaturantes. É crítico que essas condições sejam mantidas de modo a não interferir com as interacções. Um anticorpo específico para o isco é adicionado ao extracto, formando um novo complexo. Este complexo proteína:proteína é então imobilizado em pérolas de sepharose revestidas com proteína A ou proteína G. As proteínas que não se ligam são removidas em lavagens sucessivas. O complexo proteico é eluído das pérolas e dissociado com um tampão de SDS. As amostras são analisadas por SDS-PAGE seguido de *Western blotting* com anticorpos específicos para o isco e para o alvo (Promega Corporation, 2007).

Como a co-IP pode utilizar tanto proteínas-isco como proteínas-alvo que são expressas de várias maneiras, endogenamente em células de mamífero ou em sistemas de expressão sem recorrer a células, pode ser usada quer como uma ferramenta de descoberta, quer como de caracterização (Promega Corporation, 2007).

Infelizmente, devido a limitações de tempo, e a algumas dificuldades de optimização do protocolo de co-imunoprecipitação no laboratório, não nos foi possível prosseguir com esta técnica que, não só validaria os resultados já obtidos, como também permitiria observar as possíveis interacções entre a proteína Prickle e as proteínas Rock e Pias em condições mais próximas às fisiológicas, nomeadamente usando as proteínas inteiras e nas suas conformações nativas.

De qualquer modo, tendo já sido desenvolvido algum trabalho na preparação para esta técnica, seguem-se os resultados já obtidos.

III.4.1 PREPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DE EXTRACTOS DE RATINHO

Preparámos três extractos proteicos, resultantes da homogeneização de embriões de ratinho em dois estádios de desenvolvimento: E10,5 e E18,5, utilizando as técnicas descritas em Materiais e Métodos. A quantificação proteica de cada um dos extractos pelo método de Bradford foi feita e os resultados encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Resultados obtidos da quantificação proteica pelo método de Bradford, para cada um dos extractos proteicos disponíveis.

Extractos proteicos	Estádio de desenvolvimento	Concentração proteica (mg/ml)
A	E18,5	8,2
B	E18,5	8,7
C	E10,5	8,6

A quantificação proteica revelou valores semelhantes para todos os extractos, mesmo tendo em conta que se encontravam em estádios de desenvolvimento diferentes.

Os extractos proteicos de embriões de ratinho foram separados em SDS-PAGE, transferidos para uma membrana, incubada com os vários anticorpos que estamos a testar. Apresentamos os resultados obtidos com o extracto proteico C (Figs. 27 e 28) com o qual obtivemos melhores resultados a nível de *Western Blot*.

III.4.2 TESTE DOS ANTICORPOS PARA USO EM CO-IP:

Os resultados da incubação do extracto proteico C de embriões de ratinho com o anticorpo anti-Rock1 (Fig. 27) com (pista 1), extracto proteico de *E. coli* contendo His₆-Rock e His₆-Pias (pistas 2 e 3, respectivamente) mostram que o anticorpo se liga a algumas bandas, entre elas as que esperávamos – 160kDa na pista 1, correspondente à proteína Rock1 e 37kDa na pista 2, correspondente a His₆-Rock.

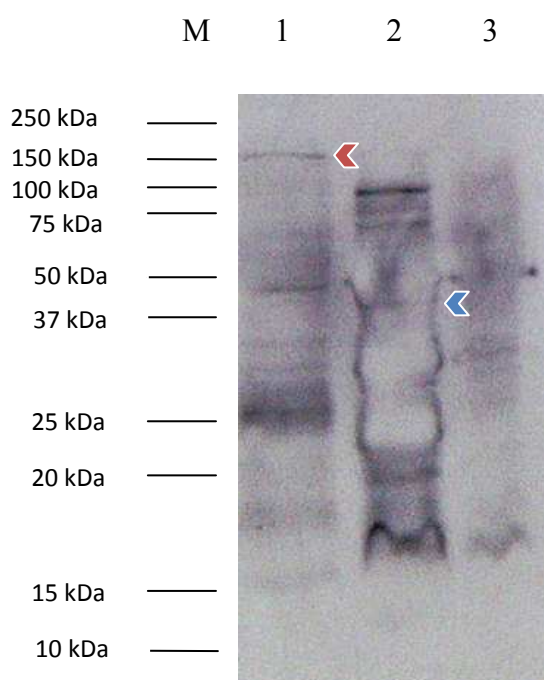




Figura 27 – Ensaio para detecção de Rock com o uso a anticorpos disponíveis: anti-Rock1 como anticorpo primário e anti-IgG de ratinho como anticorpo secundário.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto proteico C de ratinho; 2 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Rock em *E. coli*; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias em *E. coli*. () indica a banda correspondente a Rock1 (≈ 160 kDa) e () indica a banda correspondente a His₆-Rock (≈ 37kDa).

Na pista 1, embora não seja muito evidente, é visível uma banda com 160kDa correspondente à proteína Rock1 inteira presente no extracto proteico (Fig. 27). No entanto,

não se vê nitidamente uma banda de 37kDa, correspondente a His₆-Rock no extracto bruto da indução de 4h de His₆-Rock em *E. coli*, usada como controlo positivo.

Os resultados obtidos mostram que o anticorpo anti-Rock1 se liga a proteínas do extracto, entre as quais provavelmente Rock1 e indicam que estes anticorpos poderão ser usados para a técnica de co-IP, provavelmente teremos resultados mais satisfatórios uma vez que se faz um enriquecimento das proteínas de interesse.

Os resultados da incubação de uma membrana, contendo apenas o extracto proteico C de ratinho e o extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias em *E. coli*, com o anticorpo anti-Pias3 (Fig. 28) mostram bandas ténues com a massa molecular esperada – 68kDa na pista 1, correspondente à proteína Pias3 e 46kDa na pista 3, correspondente a His₆-Pias.

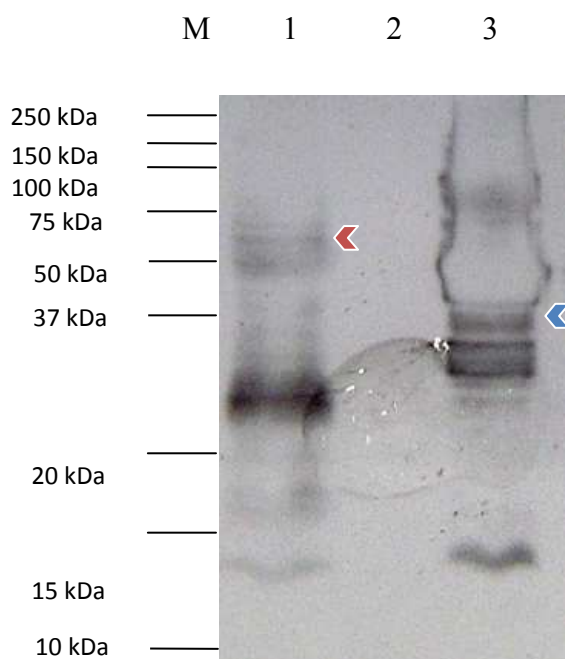


Figura 28 – Ensaio para detecção de Pias com o uso a anticorpos disponíveis: anti-Pias3 como anticorpo primário e anti-IgG de ratinho como anticorpo secundário.

M – Marcadores moleculares Precision Plus Protein™ Kaleidscope™ Standards (Bio-Rad); 1 – Extracto proteico; 2 – Pista vazio; 3 – Extracto bruto da indução de 4h de His₆-Pias. (◀) indica a banda correspondente a Pias3 (≈ 68kDa) e (◀) indica a banda correspondente a His₆-Pias (≈ 40kDa).

Em ambos os *Western Blots* apresentados, na pista 1 das Figs. 27 e 28, é visível uma banda intensa na região dos 25kDa, no extracto proteico. Isto é provavelmente devido à ligação inespecífica do anticorpo secundário, comum em ambos os casos (α -IgG de ratinho). De qualquer modo, visto as proteínas de interesse não apresentarem massas moleculares próximas dessa banda, esse facto não interfere com os resultados.

Antes da utilização destes anticorpos na técnica de co-IP, teremos de melhorar as condições de incubação (nomeadamente, utilizando mais anticorpo e enriquecendo a proteína de interesse).

Infelizmente, embora tenham sido testadas várias diluições de anticorpos não nos foi possível visualizar em chapa qualquer banda correspondente a Prickle. Apesar de não possuímos um controlo positivo, visto os fragmentos desta proteína que tínhamos disponíveis – F1 correspondente a CYS e F2 correspondente a PET – não serem reconhecidos pelo anticorpo de que dispunhamos, seria, no entanto, de esperar que o anticorpo se ligasse à proteína Pk existente no extracto proteico, mas tal não aconteceu.

O limite de tempo obrigou-nos a suspender estes trabalhos laboratoriais, não nos sendo possível otimizar as condições de interacção proteica e prosseguir para a técnica de co-IP para apresentar neste trabalho. No entanto, no laboratório do CiiEM os ensaios vão continuar para de facto validar os resultados já obtidos e, desse modo, avançar com uma contribuição para o estudo da via de sinalização da PCP.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

A via de sinalização da polaridade celular num plano (PCP) está relacionada com vários processos morfogenéticos, os quais ditam o destino celular.

A sinalização desta via é crucial, desde a embriogénese (Fanto e McNeill, 2004) até à manutenção da homeostase em órgãos adultos (Pasquale, 2008), e embora não se conheça ao certo o seu contributo, poderá estar associada ao desenvolvimento de patologias, revelando-se como um potencial alvo terapêutico em casos de cancro e de doenças neurodegenerativas (Kho *et al*, 2004; Shao *et al*, 2008; Wang, 2009).

O estudo desta via começou em *Drosophila* (Gubb *et al*, 1999; Adler *et al*, 2000) e, até hoje, as reacções específicas que a formam ainda não estão completamente esclarecidas (Vladar *et al*, 2009). A dificuldade é ainda maior no caso de vertebrados nos quais, embora a via seja de grande importância e se considere, na maior parte, como uma via conservada entre diferentes organismos (Jenny e Mlodzik, 2006), as interacções que se desenrolam estão ainda mal definidas (Wang e Nathans, 2007).

Têm sido propostos vários modelos (Lawrence *et al.*, 2008), na tentativa de explicar o mecanismo pelo qual a polaridade celular é originada. Ainda nenhum conseguiu reunir consenso e, até que seja adquirida mais informação quanto aos componentes da via, é provável que a situação se mantenha.

O presente trabalho tentou dar um contributo para o esclarecimento do funcionamento da via de sinalização da PCP, que passou pela investigação das interacções de uma proteína que, não tem sido a mais estudada, e que apresenta características intrigantes, como é o caso do seu domínio PET: a proteína Prickle.

Um sinal externo, ainda não identificado, causa uma acumulação diferencial de proteínas nas células (Povelones *et al.*, 2005). Embora Prickle não intervenha na formação inicial do gradiente, esta proteína, em conjunto com outras da via – Flamingo, Frizzled, Dishevelled, Diego e Van Gogh – constitui um ciclo de *feedback*, que acentua as diferenças

iniciais na distribuição das proteínas e, desse modo, forma a polaridade celular (Vladar *et al*, 2009).

Prickle é uma proteína que contém quatro domínios característicos: um domínio na extremidade N-terminal CYS, seguido de um domínio PET, três domínios LIM e, na extremidade C-terminal, um domínio PkH (Katoh e Katoh, 2003; Cooper *et al*, 2008).

Embora o domínio PET ainda não esteja completamente caracterizado, já foram efectuados estudos para caracterizar a sua estrutura e função. É curiosa a interacção entre este domínio e os três domínios LIM na mesma proteína, visto que os domínios LIM aparentam modular a interacção do domínio PET com outras proteínas (Gubb *et al*, 1999; Sweede *et al*, 2008); enquanto que os domínios LIM, por si só, actuam juntamente com o citoesqueleto de actina presente na célula (Khurana *et al*, 2002). Estes dados poderão ser cruciais para perceber como Prickle se movimenta preferencialmente para uma face da célula e também como e em que medida a via de sinalização da PCP conseguirá exercer um efeito sobre o citoesqueleto, levando a célula a adquirir movimentos morfogenéticos, a dividir-se ou até despoletando a apoptose (Vladar *et al*, 2009).

Para compreender mais sobre a função da Prickle inserida no contexto da via de sinalização da PCP, é necessário perceber quais e que tipo de interacções é que esta proteína estabelece na célula.

Este estudo começou com a utilização da técnica de duplo híbrido, que permitiu identificar quatro proteínas com as quais a Prickle, através do domínio PET, estabelecia interacções: Rock1, Pias3, Freud-1 e Myak-S.

Para se realizarem outras experiências comprovativas desta interacção como, por exemplo, GST pull-down, foi necessário expressar estas proteínas, assim como os fragmentos F1 e F2 de Prickle – que correspondem aos domínios CYS e PET, respectivamente – em quantidades suficientes, num sistema bacteriano (*Escherichia coli*, estirpe DH5 α). Rock, Pias, Freud e Myak foram expressas em fusão com 6 Histidinas, enquanto os fragmentos F1 e F2 foram expressos em fusão com GST. Tanto as 6 Histidinas, como o enzima GST serviriam de locais de reconhecimento específicos para os anticorpos que seriam usados na técnica de *Western Blot*. A produção de GST também foi realizada e foi importante para os ensaios de GST pull-down, realizados posteriormente, na medida em que se ligaria ao glutationato que estaria a revestir a matriz das colunas, impedindo ligações inespecíficas.

Neste trabalho, deparámo-nos com um problema: não conseguimos encontrar as condições certas para expressar a proteína His₆-Myak. Mesmo após a alteração de alguns parâmetros – concentração final de indutor, temperatura e tempo de indução – não nos foi possível obter uma expressão efectiva desta proteína. Como tal, os futuros ensaios com Myak foram suspensos.

As outras proteínas foram expressas com sucesso em *E. coli*. Os fragmentos da proteína Prickle – F1, correspondente ao domínio CYS e F2, correspondente ao domínio PET – foram expressos em fusão com o enzima Glutathione S-Transferase. Este enzima teria não só o papel de marcador, contra o qual poderiam ser usados anticorpos específicos na técnica de *Western Blot*, para identificar estes fragmentos, como também era essencial para o uso de GST pull-down, uma técnica bioquímica *in vitro*, que consiste numa cromatografia de afinidade que permite detectar interacções proteicas, em condições controladas. Para esses ensaios, era igualmente importante estar na posse de um controlo negativo – neste caso, o enzima GST sozinho – não só para se testar as colunas utilizadas, analisando se este enzima se ligaria ao glutathione que reveste a matriz das colunas, como também para nos certificarmos de que não ocorreriam ligações inespecíficas entre as proteínas detectadas pelo método do duplo híbrido e o marcador que se encontrava em fusão com os fragmentos da Prickle, potencialmente obrigando a abandonar esta técnica. GST (Fig. 6), GST-F1 (Fig. 7) e GST-F2 (Fig. 8) foram expressas em quantidades apreciáveis, que eram visíveis não só através da coloração por Azul de Coomassie após SDS-PAGE, tendo em conta a sua massa molecular; como em *Western Blot*, cuja sensibilidade e especificidade eram indispensáveis para a progressão deste trabalho. A importância do uso de *Western Blot* foi reiterada quando, face à dificuldade de observar a indução das fusões His₆-Rock (Fig. 9), His₆-Pias (Fig. 10) e His₆-Freud (Fig. 11) em SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie, nos permitiu observar as bandas correspondentes a essas proteínas de forma específica e rigorosa. O uso de anticorpos específicos para o marcador presente nestas proteínas – a cauda de 6 Histidinas – permitiu-nos identificar, de uma forma eficiente e simples, a indução destas proteínas.

Com estes resultados, podíamos avançar para os ensaios de GST pull-down. O princípio de um ensaio de GST pull-down é o de uma cromatografia de afinidade: uma proteína, que está em fusão com GST – no nosso caso, os fragmentos que dispúnhamos da Prickle, correspondentes aos domínios CYS e PET – foi adicionada à coluna, de forma a ficar ligada à matriz, sendo posteriormente adicionada uma segunda proteína – Rock, Pias, Freud

ou Myak em fusão com uma cauda de 6 Histidinas. Se estas proteínas interagissem, ficariam ambas retidas na coluna, sendo eluídas completamente no final. Caso contrário, apenas a proteína em fusão com GST ficaria ligada à matriz da coluna. Em todos os passos recolheram-se amostras de modo a que, através de *Western Blot*, se conseguissem detectar as proteínas que foram expressas em fusão com marcadores, recorrendo a anticorpos específicos para esses marcadores.

Primeiro, foi necessário preparar ensaios que funcionassem como controlos. Foi analisado se o GST, tanto sozinho, como em fusão com os fragmentos de Prickle, se ligaria ao glutathione que reveste a matriz da coluna. Ao adicionar GST (Fig. 12) e GST-F1 (Fig. 13) às colunas, tanto um como o outro foram retidos na coluna, mesmo após lavagens para remover proteínas que estabelecessem ligações inespecíficas com a matriz da coluna, sendo essas ligações apenas quebradas quando foi adicionado glutathione reduzido, eluindo-as da coluna. No caso de GST-F2 (Fig. 14), a concentração da fusão na eluição final foi inferior à esperada, comparada com os resultados que tinham sido obtidos para GST e GST-F1. Para corrigir este problema, o tempo de incubação que os extractos de células lisadas permaneciam retidos na coluna foram aumentados relativamente aos descritos na bula que acompanhava o *kit* de colunas de GST pull-down usado.

Outros controlos que foram efectuados envolviam a adição de His₆-Rock (Fig. 15), His₆-Pias (Fig. 19) e His₆-Freud (Fig. 23) directamente às colunas, de modo a observar se estas fusões estabeleceriam ligações inespecíficas com a matriz da coluna, um problema que também poderia inviabilizar a validade desta técnica. Para todos esses casos, as fusões mantiveram-se retidas nas colunas, mesmo após várias lavagens, tendo sido removidas apenas na eluição final. Colocou-se então a questão se adicionando primeiro GST, que, ao ligar-se ao glutathione, revestiria a matriz da coluna, estas proteínas, adicionadas posteriormente, continuariam a ficar retidas. Estes ensaios permitiram, por outro lado, analisar se poderia haver alguma interacção entre o GST e as proteínas ou a sua cauda de 6 Histidinas, que potencialmente interferiria com os resultados. Felizmente, em todos os três casos – GST+His₆-Rock (Fig. 16), GST+His₆-Pias (Fig. 20) e GST+His₆-Freud (Fig. 24), observou-se que, não só as fusões não interagiam de nenhum modo com o GST, como este enzima, ao revestir a matriz da coluna, impediria que as fusões ficassem retidas. Deste modo, os ensaios puderam prosseguir.

O uso do fragmento F1 – domínio CYS – da proteína Prickle em ensaios de GST pull-down foi utilizado como controlo negativo. Como era esperado, não foi observada qualquer interacção entre este fragmento e Rock (Fig. 17), Pias (Fig. 21) ou Freud (Fig.25). Estes resultados levam-nos a concluir que o domínio CYS de Prickle não intervém nas interacções de Prickle com Rock, Pias ou Freud.

Os ensaios usando o fragmento F2 – o domínio PET da Prickle – eram os de maior interesse no nosso trabalho. Foi com este fragmento que foram detectadas, com a técnica de duplo híbrido, as interacções que estávamos a estudar.

No ensaio de GST-F2+His₆-Rock (Fig. 18) foram confirmados resultados positivos para a interacção entre o fragmento PET de Prickle e a proteína His₆-Rock.

Estes resultados são consistentes com as funções já associadas a cada uma destas proteínas.

As proteínas da família das Rho GTPases, onde Rock se insere, funcionam como “interruptores” moleculares, controlando várias vias de sinalização (Noma *et al*, 2006). Rock, nas suas isoformas (Rock1 e Rock2, cujas funções são redundantes) (Shi e Wei, 2007), têm a capacidade de fosforilar e inibir a cinase LIM, que fosforila a proteína cofilina que está envolvida na despolimerização de actina, o que leva a crer que os efeitos fisiológicos de Rock levam a uma promoção da associação actina-miosina, prevenindo a despolimerização desta, controlando assim o citoesqueleto de actina (Noma *et al*, 2006).

Rock demonstrou ser de particular interesse para o estudo da apoptose. Esta proteína não só é encontrada em diversos tipos de células (tendo sido observada no músculo liso, em artérias e em neurónios motores), como também apresenta funções de regulador pro- ou anti-apoptose, dependendo do tipo de célula em que se encontra (Shi e Wei, 2007).

É conhecido o papel desta família no desenvolvimento embrionário de vertebrados, nomeadamente nos estádios iniciais da morfogénese de galinha e ratinho. Estas cinases foram também localizadas na mesoderme cardíaca, mesoderme da placa lateral e na placa neuronal (Nishimura e Takeichi, 2008).

O fecho do tubo neural é um bom exemplo da maneira de actuação de Rock. Esta proteína é recrutada para o Complexo Juncional Apical (AJC) pela Shroom3, proteína que também funciona como andaime (*scaffold*); induz a contracção das fibras de actina ao

fosforilar a *Miosine Regulatory Light Chain* (MLC) e inibindo a fosfatase de miosina. Sem estes passos o desenvolvimento embrionário não se desenrola correctamente (Nishimura e Takeichi, 2008).

A adição do inibidor Y-27632, específico para Rock, impediu a correcta progressão de acontecimentos morfogénicos, como é o caso da correcta formação do coração, do cérebro e do tubo neural, o movimento do nódulo de Hensen para a região mais caudal e a simetria esquerda-direita (Wei *et al*, 2001).

De facto, a aplicação de Y-27632 como inibidor de Rock está a ser estudada como uma forma de combate a doenças neurodegenerativas, como Huntington's Disease (HD) e *spinobulbar muscular atrophy* (SBMA), visto impedir a inibição da profilina, um pequeno factor de ligação à actina, pela Rock. A sobreexpressão de profilina impede a ligação da huntingtina (Htt) à actina, possivelmente evitando ou limitando a progressão de HD (Shao *et al*, 2008). Há também dados que defendem o uso deste inibidor para controlar o aparecimento de arteriosclerose e remodelação arterial após danos vasculares. Dados clínicos comprovam que a inibição de Rock2 por fasudil produz efeitos benéficos em pacientes com hipertensão, hipertensão pulmonar, anginas, enfartes e falhas cardíacas. É, no entanto, necessário um conhecimento mais aprofundado do papel das duas isoformas de Rock no sistema cardiovascular, de modo a permitir o desenvolvimento de inibidores específicos para uma determinada isoforma. Sem esta informação, poderão surgir problemas de especificidade e segurança destes inibidores (Noma *et al*, 2006).

Prickle é uma proteína essencial para a via de sinalização da PCP, funcionalmente antagonista de Fz, permitindo estabelecer a polaridade celular, embora não estando directamente envolvida na origem da sinalização que despoleta a via de sinalização da PCP (Tree *et al*, 2002). Por sua vez, o papel de Rock é conhecido dentro do desenvolvimento embrionário e, mais especificamente, no destino celular (Noma *et al*, 2006). O facto de funcionar como “interruptor” molecular, controlando as várias vias de sinalização e do poder que exerce sobre a integridade do citoesqueleto de actina (Noma *et al*, 2006), justifica, do ponto de vista teórico, a ligação entre estas duas proteínas e, acima de tudo, entre a via de sinalização da PCP e a sua influência sobre o citoesqueleto de actina.

A proteína Rock já foi relacionada com a aderência, a mobilidade, a proliferação, a diferenciação e a apoptose celulares (Shi e Wei, 2007), todos estes processos de extrema

importância a nível do desenvolvimento embrionário; assim como o fecho do tubo neural (Nishimura e Takeichi, 2008). O seu relacionamento com a via de sinalização da PCP parece natural, sob um ponto de vista lógico.

Esta interacção também levanta a questão se, de algum modo, estas duas proteínas funcionarem em conjunto para estabelecer a localização preferencial de Prickle na face proximal da célula, através do rearranjo do citoesqueleto, principalmente devido aos domínios LIM presentes na Pk e que se sabe estabelecem ligações com a actina, um dos principais componentes do citoesqueleto.

Há outras hipóteses levantadas sobre como este complexo poderá contribuir para o mecanismo que está na base da polaridade celular. Será que Prickle, através da ligação com Rock, terá a capacidade de influenciar a reestruturação do citoesqueleto, que estará na origem da migração das proteínas centrais da via para a sua respectiva face na célula? Ou talvez Rock, aquando da ligação de Pk, através dos domínios LIM, modela o citoesqueleto para que Pk se localize na face proximal da célula e, a partir daí, através de outras interacções, Pk consiga estabelecer o ciclo de *feedback* que amplifica as pequenas diferenças na distribuição proteica, resultando assim a polaridade celular. Outra hipótese será que a interacção Pk:Rock apenas ocorre após o estabelecimento da polaridade celular, e daí Rock que exerça o seu papel durante o desenvolvimento embrionário. Será Rock o evasivo Factor Z, mediando a distribuição das proteínas na célula?

É também interessante notar que a família das pequenas RhoA GTPases contribui para a angiogénese (Zhang *et al*, 2006), tal como a via de sinalização da PCP (Wang, 2009). Este poderá ser um alvo na luta contra o desenvolvimento do cancro ou, pelo menos, limitando a formação de metástases.

Também no ensaio GST-F2+His₆-Pias (Fig. 22), os resultados indicaram a existência de uma interacção entre o fragmento PET de Prickle e a proteína His₆-Pias.

Mais uma vez, é estabelecida uma ligação entre a via de sinalização da PCP e a sua influência no destino celular. A proteína Pias interage com STAT, uma família de proteínas que está relacionada com a proliferação, diferenciação e apoptose celular, assim como com a hematopoiese (Hebenstreit *et al*, 2005). A interacção das proteínas da família Pias com a via JAK/ STAT vai-se repercutir na produção de citocinas, nomeadamente de interferões (IFN),

como o IFN- β e IFN- γ (Shuai, 2006), estabelecendo uma relação entre Pias e a proliferação celular, nomeadamente em casos de cancro (Takaoka *et al*, 2003).

O MITF, *microphthalmia transcription factor*, está envolvido no desenvolvimento de melanócitos (Levy *et al*, 2006) e osteoclastos (Hershey e Fisher, 2004) e sabe-se que interage com Pias3 (Levy *et al*, 2002). No entanto, a relação entre este factor de transcrição e a via de sinalização da PCP ainda não é conhecida.

Foi também identificada a sua interacção com TBP (TATA-binding protein), nos C-terminais das duas proteínas, sugerindo uma interacção mais estreita entre as proteínas da família Pias e a região promotora de alguns genes (Prigge e Schmidt, 2006).

Mais recentemente, foi estabelecida uma ligação entre Pias3 e a diferenciação de fotoreceptores oculares, na medida em que a Pias3, consegue direccionar o desenvolvimento de fotoreceptores, promovendo a diferenciação de células neuronais para bastonetes ao interagir directamente com os factores de transcrição de genes específicos para estas células e, reprimindo a expressão de genes específicos, através da cascata de sinalização da proteína SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), impedir a formação de cones. Estes dados vêm estabelecer Pias3 como proteína central no desenvolvimento de fotoreceptores e, por extensão, como um dos factores de maior relevância para o desenvolvimento de células neuronais (Onishi *et al*, 2009). O papel já identificado da via de sinalização da PCP nos omatídeos de *Drosophila*, dando-lhes uma orientação predeterminada (Lawrence *et al.*, 2008), leva a crer que também poderá estar relacionada com o desenvolvimento ocular, possivelmente a nível dos vertebrados do mesmo modo que está a nível da *Drosophila*.

Esta associação entre Pias e SUMO é curiosa e levanta algumas questões interessantes. Embora a ubiquitina e a SUMO sejam bastante semelhantes, nomeadamente a nível de tamanho, estrutura e do motivo C-terminal de di-glicina; a maneira de actuarem é algo diferente. Enquanto que a ubiquitina marca substratos para degradação proteossomal, a SUMO tem como função a alteração da actividade ou função do substrato, e não da estabilidade da proteína. Das várias formas de SUMO, Pias interage com a forma SUMO E3. Estudos laboratoriais comprovaram a existência de vários defeitos, tanto morfológicos (levando à morte do embrião) como genéticos (por exemplo, a nível da segregação de cromossomas), quando é encontrado algum problema com esta associação. Para além disso, o complexo Pias3-E3, quando sobreexpresso, está aparentemente na origem de vários cancros,

incluindo cancro da mama, próstata, pulmão, colorectal e tumores cerebrais. Ou seja, a sumoilação aparenta promover o cancro em humanos e, de facto, observações laboratoriais demonstram este processo como estando desregulado em células cancerosas e em doenças neurodegenerativas (Zhao, 2007).

Considerando dados que evidenciam a desregulação da via de sinalização da PCP em células cancerosas (Wang, 2009), é possível que se tenha encontrado um alvo terapêutico para a luta contra esta doença nefasta. Deste modo, a terapêutica pode ser mais direccionada, evitando planos terapêuticos em que, muitas vezes, o processo de cura é muito nefasto, originando ainda mais riscos em termos de saúde do paciente.

Já no ensaio GST-F2+His₆-Freud (Fig. 26), os resultados levam a crer que não existe qualquer ligação entre o fragmento PET de Prickle e a proteína His₆-Freud.

Embora não haja muita informação sobre a proteína Freud, a sua função como repressor do gene da serotonina (Ou *et al*, 2003; Albert *et al*, 2004) poderia implicar, no contexto da via de sinalização da PCP, a sua influência no desenvolvimento neuronal. Não tendo sido confirmada a interacção entre esta proteína e Prickle por GST pull-down, não significa que não esteja relacionada com a via de sinalização da PCP, mas implica que essa interacção não ocorre em extractos de bactérias.

No entanto, as interacções que foram detectadas, entre Prickle e Rock e entre Prickle e Pias, levam-nos a ter uma certa esperança em relação a possíveis aplicações clínicas na área oncológica.

É um facto de que a via de sinalização da PCP se encontra desregulada em células cancerosas (Wang, 2009) e esta é uma situação que também é detectada para Pias (Zhao, 2007). Rock funciona como “interruptor” molecular, efectivamente controlando várias vias de sinalização (Noma *et al*, 2006), ao mesmo tempo que o seu papel nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário é crucial (Wei *et al*, 2001; Shi e Wei, 2007; Nishimura e Takeichi, 2008). Em estudos futuros, talvez se encontre uma maneira de, actuando sobre Rock ou Pias, de estabilizar a via de sinalização da PCP em células afectadas, travando a progressão da doença.

Considerando a função de Rock, deficiências auditivas causadas por uma incorrecta orientação dos cílios do ouvido poderiam ser corrigidas ou, pelo menos, melhoradas, oferecendo uma maior qualidade de vida ao paciente.

A ausência de interacção entre Prickle e Freud é algo desapontante. Se Freud actuar realmente sobre as células neuronais, esta informação, em conjunto com os dados que se possuem da actuação de Rock e Pias sobre neurónios, talvez permitisse um modo de combate a doenças neurodegenerativas ou, pelo menos, de controlar os sintomas, como é o caso de depressões inseridas no contexto da Doença de Huntington (Albert *et al*, 2004; van Duijn *et al*, 2007; Shao *et al*, 2008).

Devido a questões de tempo e optimização, não conseguimos expressar a proteína Myak no nosso sistema bacteriano. Isto poderá ser devido a uma toxicidade elevada desta proteína para *E. coli*, ou simplesmente por não terem sido encontradas as condições óptimas de indução para esta proteína. De qualquer modo, não deixa de ter importância a continuação dos estudos de interacção entre Prickle e Myak, sendo uma questão a considerar em trabalhos futuros.

É crucial que se façam os mesmos ensaios de interacção, mas recorrendo a métodos que mantenham, tanto quanto possível, as condições fisiológicas em que se encontram as proteínas estudadas. É neste sentido que se dirige o nosso trabalho, fazendo uso do método da co-IP o qual, pelo limite de tempo imposto dentro do quadro do estágio, não nos foi possível concluir. De qualquer modo, o uso de co-imunoprecipitação iria solucionar alguns dos problemas inerentes ao trabalho realizado. Teríamos acesso a proteínas inteiras. Já não estaríamos a usar apenas fragmentos da proteína Prickle ou proteínas Rock, Pias e Freud, como era o nosso caso os quais têm a vantagem de permitirem delimitar a região de interacção. Cada uma destas proteínas poderá ter conformações específicas que tenham sido perdidas no sistema bacteriano usado. Esse mesmo sistema não permite processos celulares como modificações pós-traducionais, que poderão de certo modo contribuir para uma determinada função da proteína. No caso particular da Prickle, apenas trabalhamos com fragmentos correspondentes a domínios isolados da proteína. Já foi sugerido que nesta proteína poderá haver interacções entre os próprios domínios, nomeadamente, uma mudança conformacional entre o domínio PET e os domínios LIM e que, para além disso, essas modificações poderão levar a uma modulação das interacções da proteína como um todo (Sweede *et al*, 2008). Este facto obriga-nos a sermos cautelosos quanto a afirmar que estas

interacções se processam em condições *in vivo*, embora todas as experiências até agora realizadas, tanto em ensaios de duplo híbrido como em GST pull-down, confirmem essa hipótese.

É igualmente importante salientar que as interacções observadas entre Rock e Pias e Prickle ocorreram com o domínio PET desta. Esse domínio ainda foi pouco estudado, não se sabendo ao certo como se processarão essas ligações. Era recomendado fazer estudos espectrométricos da Prickle, tentando desvendar mais sobre a sua estrutura e função dos seus domínios.

Embora já existam estudos de localização *in situ* de Rock (Wei *et al*, 2001), e ainda não foram realizados ensaios de co-localização desta proteína com Prickle ou de Prickle com Pias. Estes trabalhos seriam importantes para confirmar, de uma forma mais aproximada com a realidade, se estas proteínas têm, de facto, a capacidade de interagirem. Com este objectivo, seria também interessante se se pudesse seguir a migração destas proteínas ao longo do tempo, durante o desenvolvimento embrionário, observando as reacções que poderão resultar.

Outro ensaio que se poderia realizar *in situ* prende-se com as alterações que ocorrem a nível do citoesqueleto. A confirmar-se a interacção entre Pk e Rock, a sobreexpressão e o *knockout* de Prickle deverão interferir, de algum modo, com a integridade do citoesqueleto de actina. Para além disso, se a Prickle é mesmo o ponto de ligação entre a via de sinalização da PCP e o citoesqueleto, sem esta proteína, as alterações que seriam causadas no citoesqueleto pela polaridade celular já não seriam sentidas, e seria importante verificar se, de facto, os eventos se processam dessa maneira.

Por fim, a obtenção e uso de células cancerosas como objecto de estudo teria um valor inestimável. Estudando de uma forma mais aprofundada como ocorre a desordem da via de sinalização da PCP nesses casos seria importante na medida em que poderia permitir identificar qual o sinal – qual a origem do Factor X – que despoletará o início da via de sinalização da PCP, visto já ter sido observado que os mecanismos que ocorrem a nível do desenvolvimento do cancro se assemelham a fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Wang, 2009). Essa descoberta abriria caminho para a formulação de uma nova estratégia terapêutica, permitindo direccioná-la apenas para células afectadas.

Em 2009, foi descoberta uma possível ligação entre a proteína Prickle e a epilepsia mioclónica progressiva, uma doença que causa ataques epiléticos e ataxia (Bassuk *et al*,

2008), o que coloca a hipótese de que Prickle poderá não estar somente envolvida na via de sinalização de PCP ou, por outro lado, que esta via terá ligações com mais processos do que inicialmente se julgava.

As várias funções já atribuídas à via de sinalização da PCP são todas elas de uma importância extrema, não se limitando apenas ao desenvolvimento embrionário, como também a processos que ocorrem em organismos adultos, desde *Drosophila* até vertebrados. É, acima de tudo, importante que o estudo desta via prossiga.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA

V. BIBLIOGRAFIA

- Adler, P. N., Taylor, J. e Charlton, J. 2000. The domineering non-autonomy of frizzled and Van Gogh clones in the *Drosophila* wing is a consequence of a disruption in local signaling. *Mec. Dev.* 96. 197-207.
- Akhurst, R. J. e Derynck, R. 2001. TGF- β signaling in cancer – a double-edged sword. *Trends in Cell Biology.* 11. S44-S51.
- Albert, P. R. e Lemonde, S. 2004. 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist.* 10. 575-593.
- Bassuk, A. G., Wallace, R. H., Buhr, A., Buller, A. R., Afawi, Z., Shimojo, M., Miyata, S., Chen, S., Gonzalez-Alegre, P., Griesbach, H. L., Wu, S., Nashelsky, M., Vladar, E. K., Antic, D., Ferguson, P. J., Cirak, S., Voit, T., Scott, M. P., Axelrod, J. D., Gurnett, C., Daoud, A. S., Kivity, S., Neufeld, M. Y., Mazarib, A., Straussberg, R., Walid, S., Korczyn, A. D., Slusarki, D. C., Berkovic, S. F. e El-Shanti, H. I. 2008. A Homozygous Mutation in Human PRICKLE1 Causes an Autosomal-Recessive Progressive Myoclonus Epilepsy-Ataxia Syndrome *Am. J. Hum. Genet.* 83. 572-581.
- Bekman, E. e Henrique, D. 2002. Embryonic expression of three mouse genes with homology to the *Drosophila melanogaster prickles* gene. *Mechanisms of Development.* 119S. S77-S81.
- Bertet, C., Sulak, L. e Leucit, T. 2004. Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature.* 429. 667-671.
- Campbell, T. N. e Robbins, S. M. 2008. The Eph receptor/ephrin system: na emerging player in the invasion game. *Curr. Issues Mol. Biol.* 10. 61-66.
- Chen, W., Antic, D., Matis, M., Logan, C.Y., Povelones, M., Anderson, G., Nusse, R. e Axelrod, J.D. *Cell.* 133. 1093–1105.
- Cirone, P., Lin, S., Griesbach, H. L., Zhang, Y., Slusarski, D. C. e Crews, C. M. 2008. A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis.* 11. 347-360.

- Cooper, O., Sweetman D., Wagstaff, L. e Münsterberg, A. 2008. Expression of avian prickly gene during early development and organogenesis. *Developmental Dynamics*. 237. 1442–1448.
- Copp, A. J., Greene, N. D. E. e Murdoch, J. N. 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Reviews Gen.* 4. 784-793.
- Curtin, J. A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkell, R. M., Cattanch, B., Copp, A. J., Henderson, D. J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E. M., Nolan, P. M., Steel, K. P., Brown, S. D. M., Gray, I. C. e Murdoch, J. N. 2003. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr. Biol.* 13. 1129-1133.
- Dabdoub, A., Donohue, M. J., Brennan, A., Wolf, V., Montcouquiol, M., Sassoon, D. A., Hsieh, J., Rubin, J. S., Salinas, P. C. e Kelley, M. W. 2003. Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development*. 130. 2375-2384.
- Davies, A., Formstone, C., Mason, I. e Lewis, J. 2005. Planar polarity of hair cells in the chick inner ear is correlated with polarized distribution of c-flamingo-1 protein. *Dev. Dyn.* 233. 998-1005.
- Dawid, I. B., Breen, J. J. e Toyama, R. 1998. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14. 156-162.
- Desnoyers, L. e Seabra, M. C. 1998. Single prenyl-binding site on protein prenyl transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95. 12266-12270.
- Fanto, M. e McNeill, H. 2004. Planar polarity from flies to vertebrates. *Journal of Cell Science*. 117. 527-533.
- Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. e McNeill, H. 2003. The tumor-suppressor and cell adhesion molecule fat controls planar polarity via physical interaction with atrophin, a transcriptional co-repressor. *Development*. 130. 763-774.
- Garvalov, B. K., Higgins, T. E., Sutherland, J. D., Zettl, M., Scaplehorn, N., Kucher, T., Piddini, E., Griffiths, G. e Way, M. 2003. The conformational state of Tes regulates its zyxin-dependent recruitment to focal adhesions. *The Journal of Cell Biology*. 161. 33-39.

- Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F. S., Carey, M. e Shuai, K. 2001. Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Nature*. 20. 3880-3887.
- Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. e Roote, J. 1999. The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev*. 13. 2315-2327.
- Guo, N., Hawkins, C. e Nathans, J. 2004. Frizzled6 controls hair patterning in mice. *PNAS*. 101. 9277-9281.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. 166. 557-580.
- Hebenstreit, D., Horejs-Hoeck, J. e Duschl, A. 2005. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect*. 18. 243-249.
- Hershey, C. L. e Fisher, D. E. 2004. Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone*. 34. 689-696.
- Jenny, A. e Mlodzik, M. 2006. Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. 73. 738-750.
- Kadmas, J. L. e Beckerle, M. C. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 5. 920-931.
- Katoh, M e Katoh, M. 2003. Identification and characterization of human PRICKLE1 and PRICKLE2 genes as well as mouse Prickle1 and Prickle 2 genes homologous to *Drosophila* tissue polarity gene prickle. *Int. J. Molec. Med*. 11. 249-256.
- Katoh, M. 2005. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol. Rep*. 14. 1583-1588.
- Katoh, M. e Katoh, M. 2007. Comparative integromics on non-canonical WNT or planar cell polarity signaling molecules: Transcriptional mechanism of PTK7 in colorectal cancer and that of SEMA6A in undifferentiated ES cells. *Int. J. Molec. Med*. 20. 405-409.

- Kho, A. T., Zhao, Q., Cai, Z., Butte, A. J., Kim, J. Y. H., Pomeroy, S. L., Rowitch, D. H. e Kohane, I. S. 2004. Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. *Genes Dev.* 18. 629-640.
- Khurana, B., Khurana, T., Khaire, N. e Noegel, A. A. 2002. Functions of LIM proteins in cell polarity and chemotactic motility. *The EMBO Journal.* 21. 5331-5342.
- Kimura, H., Usui, T., Tsubouchi, A. e Uemura, T. 2006. Potential dual molecular interaction of the *Drosophila* 7-pass transmembrane cadherin Flamingo in dendritic morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119. 1118-1129.
- Kinoshita, N., Sasai, N., Misaki, K. e Yonemura, S. 2008. Apical accumulation of Rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation. *Mol. Biol. Cell.* 19. 2289-2299.
- Klein, T. J. e Mlodzik, M. 2005. Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21. 155-176.
- Kurayoshi, M., Oue, Naohide, Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, Toshimasa, Yasui, W. e Kikuchi, A. 2006. Expression of Want-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res.* 66. 10439-10448.
- Lawrence, P.A., Struhl, G. e Casal, J. 2008. Planar cell polarity: A bridge too far?. *Current Biology.* 18. 959-961.
- Lee, J. H., Cho, E. S., Kim, M. Y., Seo, Y., Kho, D. H., Chung, I. J., Kook, H., Kim, N. S., Ahn, K. Y. e Kim, K. K. 2005. Suppression of progression and metastasis of established colon tumors in mice by intravenous delivery of short interfering RNA targeting KITENIN, a metastasis-enhancing protein. *Cancer Research.* 65. 8993-9003.
- Levy, C., Khaled, M. e Fisher, D. E. 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* 12. 406-414.
- Levy, C., Nechustan, H. e Razin, E. 2002. A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor. *J. Biol. Chem.* 277. 1962-1966.
- Li, X., Zhang, R., Luo, D., Park, S. J., Wang, Q., Kim, Y., Min, W. 2005. Tumor necrosis factor alpha-induced desumylation and cytoplasmic translocation of homeodomain-

interacting protein kinase 1 are critical for apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK/p38 activation. *J. Biol. Chem.* 280. 15061-15070.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. e Narumiya, S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 285. 895-898.

Maskauchán, T. N. H. e Kitajewski, J. 2006. Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. *Physiology*. 21. 181-188.

Maurer-Stroh, S., Washietl, S. e Eisenhaber, F. 2003. Protein prenyltransferases: anchor size, pseudogenes and parasites. *Biol. Chem.* 384. 977-989.

Medina, A., Reintsch, W. e Steinbeisser, H. 2000. *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 92. 227-237.

Michelsen, J. W., Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C. e Winge, D. R. 2003. The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90. 4404-4408.

Midorikawa, Y., Makuuchi, M., Tang, W. e Aburatani, H. 2007. Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J. Gastroenterol.* 13. 1487-1492.

Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. e Kelley, M. W. 2003. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature*. 423. 173-177.

Nakamura, M., Nagano, T., Chikama, T. e Nishida, T. 2001. Role of the small GTP-binding protein Rho in epithelial cell migration in the rabbit córnea. *Invest. Opthal. Vis. Sci.* 42. 941-947.

Nishimura, T. e Takeichi, M. 2008. Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development*. 135. 1493-1502.

Noma, K., Oyama, N. e Liao, J. K. 2006. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290. C661-C668.

- Onishi, A., Peng, G., Hsu, C., Alexis, U., Chen, S. e Blackshaw, S. 2009. Pias3-Dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron*. 61. 234-246.
- Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., Rogaeva, A. E Albert, P. R. 2003. Freud-1: A neuronal calcium-regulator repressor of the 5-HT1A receptor gene. *J. Neurosci*. 23. 7415-7425.
- Pasquale, E. B. 2008. Eph-Ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*. 133. 38-52.
- Pekarik, V., Bourikas, D., Mignolo, M., Joset, P., Preiswerk, S. e Stoeckli, E.T. 2003. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nature Biotechnology*. 21. 93-96.
- Philips, H. M., Murdoch, J. N., Chaudhry, G., Copp, A. J. e Henderson, D. J. 2005. Vangle2 acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract. *Journal of the American Heart Association* 96. 292-299.
- Povelones, M., Howes, R., Fish, M. e Nusse, R. 2005. Genetic Evidence That *Drosophila* frizzled Controls Planar Cell Polarity and Armadillo Signaling by a Common Mechanism. *Genetics*. 171. 1643–1654.
- Prigge, J. R. e Schmidt, E. E. 2006. Interaction of protein inhibitor of activated STAT (PIAS) proteins with the TATA-binding protein, TBP. *J. Bio. Chem*. 281. 12260-12269.
- Promega Corporation. 2007. Co-Immunoprecipitation. *In* Protein Interaction Guide, pp 13-16, Promega Corporation, Madison, WI.
- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, Th., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trümper e Binder, C. 2006. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *PNAS*. 103. 5454-5459.
- Rawls, A. S., Guinto, J. B. e Wolff, T. 2002. The cadherins fat and dachsous regulate dorsal/ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Curr. Biol*. 12. 1021-1026.
- Reddy, B. V. V. G. e Irvine, K. D. 2008. The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development*. 135. 2827-2838.

- Sambrook, J. 2001. Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pull-down technique. *In* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, J. e Russell, D.W. eds.), 3^a ed., Capítulo 18, Protocolo 3, pp 18.55-18.59, CSHL Press, New York.
- Schechtman, D., Mochly-Rosen, D. e Ron, D. 2003. Glutathione S-Transferase Pull-Down Assay. *In* Protein Kinase C Protocols (Newton, A.C. ed.), 1^a ed., Capítulo 28, pp 345-350, Humana Press, Totowa.
- Schweisguth, F. 2005. Temporal regulation of planar cell polarity: insights from the *Drosophila* eye. *Cell* 121. 497—499.
- Shao, J., Welch, W. J., DiProspero, N. A. e Diamond, M. I. 2008. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol. Cell. Bio.* 28. 5196-5208.
- Shi, J. e Wei, L. 2007. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 55. 61-75.
- Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D. e Uemura, T. 2006. Polarized transport of frizzled along planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Developmental Cell*. 10. 209-222.
- Shimojo, M. e Hersh, L. B. 2006. Characterization of the REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP): localization and interaction with REST/NRSF. *J. Neurochem.* 96. 1130-1138.
- Shuai, K. 2006. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Research*. 16. 196-202.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T. e Walz, G. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. 2005. *Nature Genetics*. 37. 537-543.
- Steeg, P. S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*. 12. 895-904.
- Surawska, H., Ma, P. C. e Salgia, R. 2004. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 15. 419-433.

- Sweede, M., Ankem, G., Chutvirasakul, B., Azurmendi, H. F., Chbeir, S., Watkins, J., Helm, R. F., Finkielstein, C. V. e Capelluto, D. G. S. 2008. Structural and membrane binding properties of the Prickle PET domain. *Biochemistry*. 47. 13524-13536.
- Tada, M., Concha, M. L. e Heisenberg, C. P. 2002. Non-canonical Wnt singnaling and regulation of gastrulation movements. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13. 252-260
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. e Taniguchi, T. 2003. Integration of interferon- α/β signaling to p53 responses in tumor suppression and antiviral defence. *Nature*. 424. 516-523.
- Takeuchi, M., Nakabayashi, J., Sakaguchi, T., Yamamoto, T. S., Takahashi, H., Takeda, G. e Ueno, N. 2003. The prickle-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements. *Curr. Biol.* 13. 674-679.
- Titus, M. A., Wessels, D., Spudich, J. A. e Soll, D. 1993. The unconventional myosin encoded by the *myoA* gene plays a role in *Dictyostelium* motility. *Mol. Biol. of the Cell*. 4. 233-246.
- Tree, D.R.P., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D. e Axelrod, J.D. 2002. Prickle Mediates Feedback Amplification to Generate Asymmetric Planar Cell Polarity Signaling. *Cell*. 109. 371–381.
- van Dujin, E., Kingma, E. M. e van der Mast, R. C. 2007. Psychopathology in Huntington's Disease gene carriers. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 19. 441-448.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D. e Moon, R. T. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell*. 5. 367-377.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D. e Moon, R. T. 2003. A second canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell*. 5. 367-377.
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. e Moon, R. T. 2003. Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr. Biol.* 13. 680-685.
- Vladar, E. K., Antic, D. e Axelrod, J. D. 2009. Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1. 1-19.

- Wang, J., Hamblet, N. S., Mark, S., Dickinson, M. E., Brinkman, B. C., Segil, N., Fraser, S. E., Chen, P., Wallingford, J. B. e Wynshaw-Boris, A. 2006. Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development*. 133. 1767-1778.
- Wang, Y. 2009. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 8. 2103-2109.
- Wang, Y. e Nathans, J. 2007. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*. 134. 647-658.
- Wang, Y. e Steinbeisser, H. 2009. Molecular basis of morphogenesis during vertebrate gastrulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 66. 2263-2273.
- Wang, Y., Guo, N. e Nathans, J. 2006. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neuro.* 26. 2147-2156.
- Wei, L., Roberts, W., Wang, L., Yamada, M., Zhang, S., Zhao, Z., Rivkees, S. A., Schwartz, R. J. e Imanaka-Yoshida, K. 2001. Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. *Development*. 128. 2953-2962.
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D. e Luo, L. 2001. *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*. 105. 81-91
- Yang, C., Axelrod, J. D. e Simon, M. A. 2002. Regulation of frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye. *Cell*. 108. 675-688.
- Zerlin, M., Julius, M. A. e Kitajewski, J. 2008. Wnt/ Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*. 11. 63-68.
- Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J. e Wu, C. 2002. Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *Journal of Cell Science*. 115. 4777-4786.
- Zhang, Y., Yeh, J. R., Mara, A., Ju, R., Hines, J. F., Cirone, P., Griesbach, H. L., Schneider, I., Slusarski, D. C., Holley, S. A. e Crews, C. M. 2006. A chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin. *Chem. Biol.* 13. 1001-1009.

Zhao, J. 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* 64. 3017-3033.